

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**cAMP als zentraler Botenstoff der hyperosmotischen Stressantwort  
in *Dictyostelium discoideum***

Alexander Ott

aus

München

2000

### Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. D. Oesterhelt betreut.

### Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den

Dissertation eingereicht am:

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterhelt

2. Berichterstatter: Dr. C. Eckerskorn

Tag der mündlichen Prüfung:

Teile der vorliegenden Antwort wurden bereits veröffentlicht:

Zischka, H., Oehme, F., Pintsch, T., Ott, A., Keller, H., Kellermann, J. und Schuster, S.C. 1999. Rearrangement of cortex proteins constitutes an osmoprotective mechanism in *Dictyostelium*. *EMBO J.* **18**:4241-4249.

Ott, A., Oehme, F., Keller, H. und Schuster, S.C. 2000. Osmotic stress response in *Dictyostelium* is mediated by cAMP. *EMBO J.*, **19**:5782-5792.

#### Konferenzpräsentationen

Zischka, H., Oehme, F., Pintsch, T., Ott, A., Keller, H., Kellermann, J. and Schuster, SC. Osmotic Stress Response in *Dictyostelium* Investigated by Proteomic Methods. DECHEMA Conference Frankfurt, Germany: Funktional Genome Research in Microorganisms, 1999

Zischka, H., Oehme, F., Kellermann, J., Ott, A. and Schuster, SC. Hyperosmotic Stress Induces Protein Translocation in *Dictyostelium discoideum*. 3<sup>rd</sup> 2D Gelelectrophoresis Meeting Siena, Italy: From Genome to Proteome, 1999

Ott, A., Oehme, F., Keller, H. and Schuster, SC. DokA is Regulating cAMP Levels in Response to Osmotic Stress in *Dictyostelium discoideum*. Gordon Research Conference Ventura, CA: Sensory Transduction in Microorganisms, 2000

Ott, A., Keller, H., Oehme, F. and Schuster, SC. Osmotic stress response in *Dictyostelium discoideum* is mediated by cAMP. Herbsttagung der GBM München, 2000

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>3</b>
2.1	<i>Der sekundäre Botenstoff cAMP.....</i>	<i>3</i>
2.2	<i>Die Rolle von cAMP in Dictyostelium discoideum.....</i>	<i>4</i>
2.2.1	Die Entwicklung von <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	4
2.2.2	Der cAMP-Stoffwechsel in <i>D. discoideum</i> .....	7
2.3	<i>Zwei-Komponenten-Signaltransduktion.....</i>	<i>8</i>
2.4	<i>Mechanismen der Osmoregulation.....</i>	<i>11</i>
2.4.1	Osmotischer Druck und Tonizität.....	11
2.4.2	Osmoregulation in <i>D. discoideum</i> .....	13
2.5	<i>Das Hybrid-Histidinkinase-Homolog Doka.....</i>	<i>14</i>
2.6	<i>Ziel der Arbeit.....</i>	<i>15</i>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>16</b>
3.1	<i>Die Rolle von cAMP im hyperosmotischen Stress.....</i>	<i>16</i>
3.1.1	Hyperosmotischer Stress bewirkt in <i>D. discoideum</i> eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration.....	16
3.1.2	<i>doka</i> <sup>-</sup> -Zellen weisen eine verringerte intrazelluläre cAMP-Konzentration auf.....	19
3.1.3	Die Änderung der cAMP-Konzentration in <i>acaA</i> <sup>-</sup> -Zellen ähnelt dem Verlauf in Wildtypzellen.....	21
3.1.4	Die cAMP-Änderung im Osmostress bei Überexpression von Doka-Domänen.....	23
3.1.5	Gegenüberstellung der basalen intrazellulären cAMP-Konzentrationen.....	27
3.1.6	Die Gesamt-cAMP-Konzentration unter hyperosmotischem Stress.....	29
3.1.7	Die Doka-Abhängigkeit des hyperosmotisch bedingten Anstiegs der Gesamt-cAMP-Konzentration.....	30
3.1.8	Der hyperosmotisch bedingte Anstieg der Gesamt-cAMP-Konzentration ist auch RdeA-abhängig.....	31
3.1.9	Der Export von cAMP ist in Ax2- und <i>doka</i> <sup>-</sup> -Zellen nicht beeinträchtigt.....	33

<b>3.2</b>	<b><i>Untersuchung der Osmoresistenz in Stämmen mit verändertem</i></b>	
	<b><i>cAMP-Metabolismus</i></b> .....	<b>36</b>
3.2.1	Überleben von Stämmen mit verringertem cAMP-Spiegel unter hyperosmotischem Stress .....	36
3.2.2	Die Osmosensitivität von <i>dokA</i> <sup>-</sup> -Zellen ist durch 8-Br-cAMP supprimierbar .....	38
3.2.3	Extrazelluläres cAMP erhöht die Überlebensrate von <i>dokA</i> <sup>-</sup> -Zellen nur geringfügig ... .....	39
<b>3.3</b>	<b><i>Die Überexpression der Regulatordomäne von DokA verringert die</i></b>	
	<b><i>Phosphodiesterase-Aktivität von RegA</i></b> .....	<b>41</b>
<b>3.4</b>	<b><i>In vitro-Interaktion von RdeA und DokA-RR</i></b> .....	<b>44</b>
3.4.1	Heterologe Expression der DokA-Regulator-Domäne in <i>E. coli</i> .....	44
3.4.2	Die DokA-Regulator-Domäne verringert die Phosphorylierung von RdeA.....	45
3.4.3	Die Regulator-Domäne von DokA dephosphoryliert RdeA .....	46
<b>3.5</b>	<b><i>Vergleich von RR-Zellen mit Zellen die andere Regulator-Domänen</i></b>	
	<b><i>überexprimieren</i></b> .....	<b>47</b>
3.5.1	Die homologe Überexpression weiterer Regulator-Domänen .....	48
3.5.2	Entwicklungsphänotyp der <i>D. discoideum</i> -Stämme <i>dhkA-RR</i> <sup>+</sup> und <i>ssg478-RR</i> <sup>+</sup> .....	49
<b>3.6</b>	<b><i>Membran und Cytoskelett als Effektoren bei hyperosmotischem Stress</i></b> .....	<b>51</b>
3.6.1	Die Proteinmenge der Membranfraktion nimmt bei osmotischem Stress zu.....	51
3.6.2	Veränderungen im Cytoskelett durch hyperosmotischen Stress.....	53
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b><i>cAMP ist ein sekundärer Botenstoff im hyperosmotischen Stress und</i></b>	
	<b><i>wird durch DokA reguliert</i></b> .....	<b>56</b>
<b>4.2</b>	<b><i>Die DokA-abhängige Regulation der cAMP-Konzentration erfolgt über</i></b>	
	<b><i>den RdeA/RegA-Phosphorelay</i></b> .....	<b>60</b>
<b>4.3</b>	<b><i>Modell der Wirkungsweise von DokA auf den cAMP-Metabolismus in</i></b>	
	<b><i>D. discoideum</i></b> .....	<b>63</b>

4.4	<i>Der osmoregulatorische Signalweg in D. discoideum</i> .....	69
5	<b>Material und Methoden</b> .....	75
5.1	<b>Materialien</b> .....	75
5.1.1	Stämme.....	75
5.1.2	Antikörper .....	76
5.1.3	Enzyme.....	77
5.1.4	Oligonukleotide.....	77
5.1.5	Antibiotika .....	78
5.1.6	Reagenzien .....	79
5.1.7	Geräte .....	81
5.1.8	Sonstige Materialien .....	82
5.1.9	Puffer.....	83
5.1.10	Medien .....	88
5.2	<b>Zellbiologische Methoden</b> .....	90
5.2.1	Anzucht von <i>D. discoideum</i> -Zellen auf Agarplatten.....	90
5.2.2	Adhäsive Zucht von <i>D. discoideum</i> -Zellen in Gewebekulturschalen.....	90
5.2.3	Anzucht von <i>D. discoideum</i> -Zellen in Schüttelkultur.....	90
5.2.4	Konservierung von <i>D. discoideum</i> -Sporen .....	91
5.2.5	Konservierung von <i>D. discoideum</i> -Zellen .....	91
5.2.6	Entwicklung von <i>D. discoideum</i> -Zellen auf Phosphatagar.....	92
5.2.7	Entwicklung von <i>D. discoideum</i> -Zellen auf cAMP-S-haltigem Normalagar .....	92
5.2.8	Transformation von <i>D. discoideum</i> -Zellen .....	92
5.2.9	Sorbitolschock in Flüssigkultur .....	93
5.2.10	Bestimmung der Überlebensrate nach hyperosmotischem Schock .....	93
5.2.11	Bestimmung der Überlebensrate nach hyperosmotischem Schock mit Nukleotidzugabe .....	94
5.2.12	Bestimmung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen .....	94
5.2.13	Bestimmung der Gesamt-cAMP-Konzentration.....	95
5.2.14	Parallele Bestimmung intra- und extrazellulärer cAMP-Konzentration.....	96
5.2.15	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Stämme .....	96
5.2.16	Transformation von Plasmiden in kompetente <i>E. coli</i> -Stämme.....	97
5.3	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	97
5.3.1	Enzymatische Modifikation von DNA .....	97
5.3.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	98
5.3.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	98
5.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	99
5.3.5	Reinigung von PCR-Produkten.....	100

5.3.6	DNA-Sequenzierung.....	100
5.3.7	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Stämmen.....	102
5.3.8	Isolierung genomischer DNA aus <i>D. discoideum</i> -Zellen .....	102
5.3.9	RT-PCR.....	103
<b>5.4</b>	<b><i>Proteinchemische Methoden</i> .....</b>	<b>104</b>
5.4.1	Herstellung von Lysaten aus <i>D. discoideum</i> -Zellen .....	104
5.4.2	Isolierung der Cytoskelettfraktion und der cytosolischen Fraktion aus <i>D. discoideum</i> -Zellen.....	104
5.4.3	Isolierung der Membranfraktion aus <i>D. discoideum</i> -Zellen .....	104
5.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	105
5.4.5	Coomassie-Färbung .....	106
5.4.6	Silberfärbung.....	106
5.4.7	Geltrocknung.....	106
5.4.8	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	107
5.4.9	Semi-trockener Western-Transfer (Western Blot).....	108
5.4.10	Immunfärbung.....	108
5.4.11	Coomassie-Färbung von PVDF-Membranen.....	109
5.4.12	Reinigung von monoklonalen Antikörpern.....	109
5.4.13	Reinigung von GST-RdeA.....	110
5.4.14	Reinigung von GST-RR bzw. GST-RRDA .....	111
5.4.15	Autoradiographie .....	111
5.4.16	<i>In vitro</i> - <sup>32</sup> P-Isotopenmarkierung .....	112
5.4.17	Dephosphorylierung von RdeA .....	112
<b>5.5</b>	<b><i>Bestimmung der Phosphodiesterase-Aktivität</i> .....</b>	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>117</b>

## 1 Zusammenfassung

Zyklisches 3':5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) ist sowohl als extrazellulärer Lockstoff als auch als intrazelluläres Signalmolekül von entscheidender Bedeutung in der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum*. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass dieser sekundäre Botenstoff auch eine zentrale Rolle in der hyperosmotischen Stressantwort von *D. discoideum* spielt. Wildtypzellen reagieren auf hyperosmotischen Stress mit einem transienten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, der von dem Hybridhistidinkinase-Homolog DokA abhängig ist. DokA ist essentiell für das Überleben von *D. discoideum*-Zellen unter hyperosmotischen Bedingungen. Die Osmosensitivität von *doka*<sup>-</sup>-Zellen beruht auf dem gestörten cAMP-Metabolismus und kann durch die transiente Zugabe eines membrangängigen cAMP-Analogs weitgehend aufgehoben werden. Der Einfluss von DokA auf den intrazellulären cAMP-Spiegel zeigt sich auch in ungeschockten Zellen: Während die basale cAMP-Konzentration in *doka*<sup>-</sup>-Zellen reduziert ist, weisen Zellen, die die Regulator-Domäne von DokA überexprimieren, einen erhöhten cAMP-Spiegel auf.

Basierend auf diesen Daten wurde ein Modell der Regulation des intrazellulären cAMP-Spiegels durch DokA entwickelt. Die Regulator-Domäne von DokA wirkt hierbei als Phosphatase des Histidin-Phosphotransferproteins RdeA, welches durch Phosphorylierung die Phosphodiesterase RegA aktiviert. Durch die Phosphatase-Aktivität von DokA wird somit der über den RdeA/RegA-Phosphorelay gesteuerte intrazelluläre cAMP-Abbau inhibiert. Die *in vitro*-Dephosphorylierung von RdeA durch die Regulator-Domäne von DokA konnte ebenso nachgewiesen werden wie die verringerte Phosphodiesterase-Aktivität bei homologer Überexpression des DokA-Regulators. Die Effekte dieser Überexpression auf cAMP-Haushalt und Entwicklung sind DokA-spezifisch und von dem konservierten Aspartylrest D1567 der Regulator-Domäne abhängig.

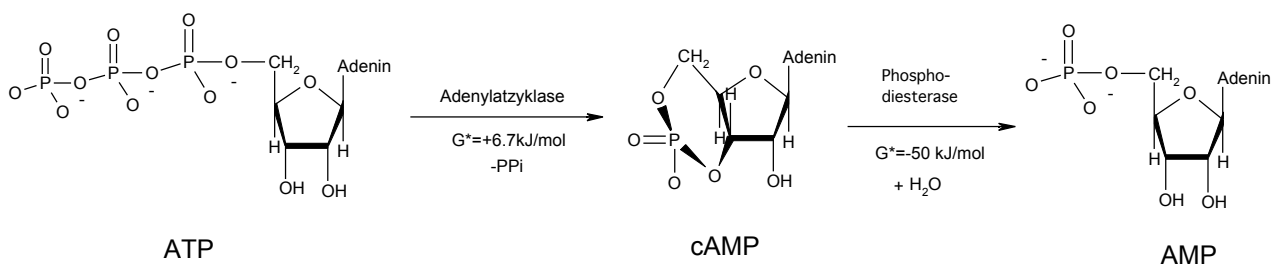


Bei Untersuchungen zu den Effektoren der hyperosmotischen Stressantwort in *D. discoideum* wurden Veränderungen in Aufbau und Zusammensetzung von Membran und Cytoskelett beobachtet. Dabei konnten sieben Proteine identifiziert werden, die eine deutliche Translokation bei hyperosmotischem Stress erfahren. Eine Übersicht stellt die osmoregulatorischen Signalwege in *D. discoideum* dar und vergleicht die Rolle von 2-Komponenten-Systemen in der Osmoregulation bei Eukaryoten.

## 2 Einleitung

### 2.1 Der sekundäre Botenstoff cAMP

Neben der Reizweiterleitung durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen werden Signale in Zellen auch über niedermolekulare Botenstoffe übertragen (Krauss, 1997). Die Synthese oder Freisetzung solcher sekundären Botenstoffe oder intrazellulären Mediatoren erfolgt als Reaktion auf einen extrazellulären Reiz, etwa veränderte Umweltbedingungen oder die Bindung eines primären Botenstoffs oder Hormons. Ein wichtiger Vertreter dieser sekundären Botenstoffe ist das 1958 entdeckte zyklische Adenosin-3':5'-monophosphat, kurz cAMP (Sutherland und Rall, 1958). In der Zelle wird cAMP in einer von Adenylatzyklastasen katalysierten Reaktion aus ATP gebildet, die Inaktivierung des Botenstoffs erfolgt durch Phosphodiesterasen, die die Hydrolyse von cAMP zu 5'-AMP katalysieren (Gl. 1).



Gleichung 1

Die durch cAMP regulierten Effekte umfassen je nach Zelltyp und Organismus die unterschiedlichsten Bereiche, v.a. in Transkription und Stoffwechsel (zur Übersicht dienen Robison *et al.*, 1968; Mooibroek und Wang, 1988; Tang und Gilman, 1992). Diese Effekte werden in erster Linie durch die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (Proteinkinase A, PKA)

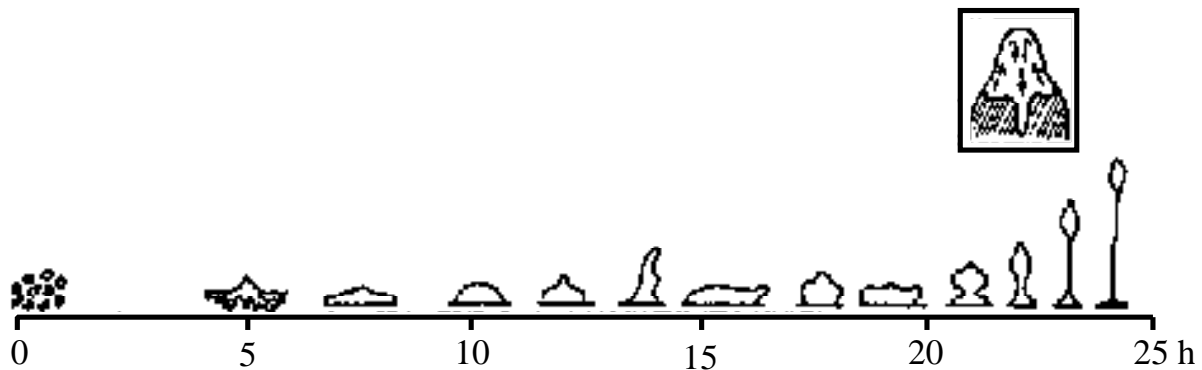
ausgelöst, einer Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinase (Krebs, 1989; Taylor *et al.*, 1990; Walsh und Van Patten, 1994; Francis und Corbin, 1994). So reguliert PKA neben zahlreichen Enzymen des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels auch cytoskelettale Proteine wie Troponin I (England, 1976; McConnell *et al.*, 1997), die  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität von Membranen (Walsh *et al.*, 1979; Huggins und England, 1983; Grimaldi *et al.*, 1999) und Komponenten anderer Signaltransduktionssysteme, etwa die MAPKKK c-Raf (Cook und McCormick, 1993; Mischak *et al.*, 1996). Auch eine Feedback-Kontrolle durch die aktivierende Phosphorylierung von Phosphatasen, die damit der PKA entgegenwirken, wurde beobachtet (Cohen, 1989). Eine cAMP-abhängige Aktivierung der Transkription wird in Eukaryoten durch “cAMP-Response Element-Bindeproteine” (CREB) vermittelt, welche bei Phosphorylierung durch PKA spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte “cAMP response elements” (CRE) binden (Brindle und Montminy, 1992). In Prokaryoten existiert ein analoges Regulationssystem über den cAMP-bindenden Transkriptionsfaktor CRP, das insbesondere bei Nahrungsmangel durch erhöhte cAMP-Synthese aktiviert wird (Botsford und Harman, 1992).

## **2.2 Die Rolle von cAMP in *Dictyostelium discoideum***

### **2.2.1 Die Entwicklung von *Dictyostelium discoideum***

Eine besonders vielseitige Rolle spielt cAMP in *Dictyostelium discoideum*, einer im Waldboden lebenden Myxamoebe, die bei ausreichender Verfügbarkeit an Nahrung, i. d. Regel Bakterien, als Einzeller wächst. Bei Nahrungsmangel schließen sich die Zellen jedoch zu einem bis zu etwa  $10^5$  Zellen umfassenden multizellulären Organismus mit unterschiedlich differenzierten Zelltypen zusammen, der über verschiedene Entwicklungsstadien schließlich zur Ausbildung eines Fruchtkörpers mit Sporenzellen führt (Abb. 2-1). Diese Sporen sind darauf ausgerichtet, längeranhaltende Perioden ungünstiger Umweltbedingungen zu überdauern und unter besseren

Verhältnissen wieder als Einzeller auszukeimen (Bonner, 1947). Auch hier bewirkt der Nahrungsmangel eine Zunahme der cAMP-Produktion. Zum einen dient das Nukleotid dabei wie in Metazoen als intrazellulärer Mediator in der Signaltransduktion (Verkerke-van Wijk und Schaap, 1997; Aubry und Firtel, 1999), zum anderen wird cAMP von *D. discoideum* auch als extrazelluläres Morphogen und Chemoattraktans sezerniert (Konijn *et al.*, 1967).



**Abbildung 2-1**

Die Entwicklung von *D. discoideum* (Bozzaro, 1992). Kurz nach Beginn der Hungerphase beginnen die Zellen zu aggregieren, was nach etwa 5 h zu sichtbaren Zellströmen führt. Bei zunehmender Zelldichte im Aggregationszentrum bildet sich nach ca. 10 h ein dreidimensionaler "Mound"; in diesem Stadium kann von einem multizellulären Organismus gesprochen werden. Das weitere Aufrichten führt zur Ausbildung eines motilen "Slugs" ( $t = 15-17$  h), aus dem in der Kulminationsphase über verschiedene morphologisch definierte Stadien schließlich nach 24 h der fertig entwickelte Fruchtkörper mit langem Stiel und Sporenkopf (Sorus) entsteht.

Die cAMP-Ausschüttung bei einsetzendem Nahrungsmangel erfolgt dabei pulsweise im Abstand von etwa sechs Minuten (Aubry und Firtel, 1999). Diese extrazellulären cAMP-Pulse werden durch vier verschiedene cAMP-Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität detektiert, die zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören und im Laufe der Entwicklung differenziell exprimiert werden (Ginsburg *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1992). Neben der Aktivierung der Signalwege, die eine gerichtete Chemotaxis ermöglichen, wird auch die Adenylatzyklase A (ACA) aktiviert (Roos und Gerisch, 1976; Klein *et al.*, 1977; Pitt *et al.*, 1992) und weiteres cAMP ausgeschüttet, wodurch eine Weiterleitung und Verstärkung des Signals gewährleistet wird. Die

ACA-Aktivierung erfolgt dabei nicht über  $G_s$ , sondern über die Freisetzung des  $G$ -Komplexes (Wu *et al.*, 1995; Jin *et al.*, 1998). Die Oszillation der cAMP-Sezernierung führt zu einer makroskopisch sichtbaren wellenförmigen Propagierung (Siegert und Weijer, 1997), die die Orientierung der Zellen entlang des cAMP-Gradienten und damit die Aggregation ermöglicht. Dies führt zu einem als “Mound” bezeichneten Entwicklungszustand, in dem der weitere Anstieg der extrazellulären cAMP-Konzentration auf mikromolare Werte (Abe und Yanagisawa, 1983) die Differenzierung in Prä-Stiel- und Prä-Sporenzellen bewirkt (Firtel, 1995). In beiden Zelltypen ist dabei der parallel stattfindende Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration der Auslöser für die Differenzierung. Die Rückkopplung auf den cytosolischen cAMP-Pool und die PKA-Aktivität initiiert die Transkription der postaggregativen Gene. Zur Expression dieser Gene ist die Aktivierung der PKA notwendig, für die Induktion von Prä-Sporenzell-Genen ist dies jedoch nicht hinreichend, es wird das Signalmolekül cAMP selbst benötigt (Simon *et al.*, 1992; Hopper *et al.*, 1995).

In dem sich aufrichtenden “Mound” und dem daraus entstehenden “Slug”, einem motilen, von einer Schleimschicht umgebenen, wurmartigen Entwicklungsstadium, erfolgt die Einstellung des Gleichgewichts aus 20-30 % Prä-Stielzellen und 70-80 % Prä-Sporenzellen und deren Sortierung (Nanjundiah, 1997; Aubry und Firtel, 1999). Diese erfolgt ebenfalls in Reaktion auf cAMP-Wellen, die durch den Slug propagieren (Traynor *et al.*, 1992). Aufgrund einer erhöhten cAMP-Sensitivität der Prä-Stielzellen, sammeln sich diese vor allem im vorderen Bereich des Slugs, während die Prä-Sporenzellen den Großteil des restlichen Slugs bilden. Diese chemotaktische Sortierung wird durch einen sich im Slug ausbildenden cAMP-Gradienten bewahrt. Der Gradient entsteht durch eine erhöhte Expression einer extrazellulären Phosphodiesterase in Prä-Stielzellen, die somit an der Slugspitze akkumuliert (Verkerke-van Wijk und Schaap, 1997). Die Abnahme der cAMP-Konzentration im Kern der spiralförmigen cAMP-Welle an der Slug-Spitze löst schließlich die Kulmination und die damit einhergehende terminale Differenzierung zu Stielzellen und Sporen aus (Bretschneider *et al.*, 1995).

cAMP ist auch intrazellulär zur terminalen Differenzierung beider Zelltypen essentiell (Brown *et al.*, 1997), ebenso zur Aufrechterhaltung der Dormanz von Sporen. Neben dem Keimungsinhibitor Discadenin (Abe *et al.*, 1976) ist eine hohe Osmolarität im Sorus hierfür notwendig (Cotter, 1977), die auch die Rückkehr keimender Sporen zur Dormanz bewirkt (Cotter, 1981).

Über die Rolle von cAMP in vegetativ wachsenden Zellen ist bisher wenig bekannt. Mit zunehmenden Erkenntnissen über die Aktivität und Bedeutung von Adenylatzyklen und Proteinkinase A in diesem Stadium (Kim *et al.*, 1998; Primpke *et al.*, 2000) rückt die Bedeutung dieses Botenstoffs in *D. discoideum* auch auf anderen Feldern als der Entwicklung verstärkt in den Blickpunkt.

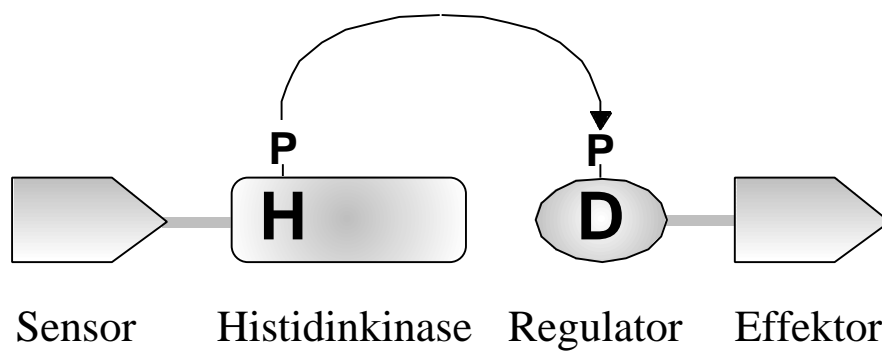
### 1.1.2 Der cAMP-Stoffwechsel in *D. discoideum*

Die Vielzahl an Effekten von cAMP erfordert eine exakte Regulation von Synthese und Degradation dieses Botenstoffs. Während der Aggregation wird cAMP in erster Linie von der Adenylatzyklase A, einem Homolog der Säugeradenylatzyklen, gebildet (van Haastert, 1997), während die Adenylatzyklase G (ACG), die zur Familie der vor allem in Parasiten anzutreffenden Klasse II Adenylatzyklen zählt, nur in reifen Sporen exprimiert wird (Verkerke-van Wijk und Schaap, 1997; Aubry und Firtel, 1999). Die erhöhte Osmolarität im Sporenkopf aktiviert die Adenylatzyklase ACG, was durch die erhöhte PKA-Aktivität die Dormanz der Spore bewahrt (van Es *et al.*, 1996). Daneben wurde die Aktivität einer weiteren Adenylatzyklase in sich schnell entwickelnden *D. discoideum*-Mutanten entdeckt (Kim *et al.*, 1998). Sie lässt sich vermutlich auf die kürzlich entdeckte Adenylatzyklase AcrA zurückführen. Diese wird am stärksten während der Kulminationsphase exprimiert, kann jedoch während der gesamten Entwicklung nachgewiesen werden (Soderbom *et al.*, 1999). Die Degradation von cAMP erfolgt extrazellulär über die bereits erwähnte Phosphodiesterase. Sie tritt in zwei Spleissvarianten auf, als sekretierte ePDE und als an der extrazellulären Seite der Plasmamembran verankerte mPDE (Malchow *et al.*, 1972; Gerisch,

1976). Daneben wurde auch die intrazelluläre Phosphodiesterase RegA gefunden (Shaulsky *et al.*, 1996).

### **1.3 Zwei-Komponenten-Signaltransduktion**

RegA besteht aus einer C-terminalen Phosphodiesterase-Domäne, die homolog zu cAMP-spezifischen Phosphodiesterasen aus Säugern ist, und einer N-terminalen Domäne mit Homologie zu bakteriellen Regulatoren (Shaulsky *et al.*, 1996). Diese Regulatoren sind Bestandteil von Zwei-Komponenten-Systemen, dem zentralen Signaltransduktionssystem in Prokaryoten (Parkinson, 1993; Hoch, 1995, Rudolph *et al.*, 1995). Es besteht prototypisch aus zwei Proteinen (Abb. 2-2): einer Histidinkinase und einem Regulator (engl.: response regulator). Zwei-Komponenten-Systeme dienen in erster Linie der Detektion sich rasch verändernder Umweltbedingungen, wie etwa Nährstoff- und Schadstoffkonzentrationen, Temperatur, Licht, Osmolarität, Azidität oder dem Redoxzustand (Hoch und Silhavy, 1995), die einer adäquaten zellulären Reaktion bedürfen. Eine Rezeptor- oder Input-Domäne empfängt ein Signal, wodurch die Histidinkinase aktiviert wird und an einem konservierten Histidinrest autophosphoryliert. Die Phosphorylgruppe wird anschließend auf einen konservierten Aspartylrest im Regulator übertragen. Hierdurch wird die Aktivität einer Effektdomäne, die sich in der Regel am C-Terminus des Regulators befindet, moduliert und eine Antwort der Zelle auf den Stimulus ausgelöst. Der Ausgangszustand wird durch Autodephosphorylierung oder eine Phosphatase wiederhergestellt (Stock *et al.*, 1995).

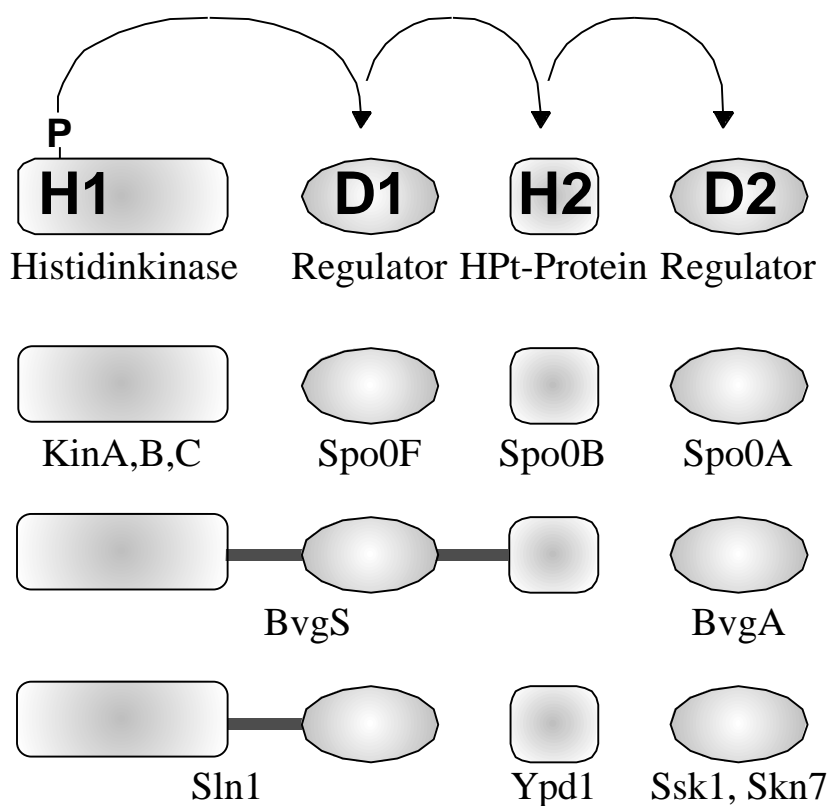
**Abbildung 2-2**

Schematische Darstellung der Signaltransduktion in einem prototypischen Zwei-Komponenten-System. Die Aktivierung eines Sensors führt zur Autophosphorylierung eines Histidinrestes (H) am N-Terminus der Kinasedomäne. Diese Phosphorylgruppe wird auf einen Aspartylrest (D) des Regulators übertragen, wodurch die Effektordomäne aktiviert wird.

Eine komplexere Variante des Zwei-Komponenten-Systems stellt der mehrstufige Phosphorelay dar. Hierbei werden die Stufen eines klassischen Zwei-Komponenten-Systems zweimal durchlaufen: Nach der Autophosphorylierung der Histidinkinase (H1) wird die Phosphorylgruppe auf einen ersten Regulator (D1) übertragen. Von dessen Aspartylrest gelangt die Phosphorylgruppe anschließend auf einen konservierten Histidinrest eines Histidin-Phosphotransfer-Proteins (HPt-Protein, H2), das keine Autokinaseaktivität besitzt, bevor schließlich die Übertragung auf einen zweiten Regulator (D2) erfolgt (Abb. 2-3). Dieses Signaltransduktions-System wurde erstmals in *Bacillus subtilis* entdeckt, wo der Kin/Spo0-Phosphorelay die Initiation der Sporulation reguliert (Burbulys *et al.*, 1991). An diesem System werden auch die Vorteile eines mehrstufigen Phosphorelays deutlich, der abgesehen von der Autophosphorylierung an H1 keine weitere Möglichkeit der Signalamplifikation bietet (Appleby *et al.*, 1996): Zum einen ermöglicht ein solches Signaltransduktionssystem die Integration von Signalen aus unterschiedlichen Quellen, hier von den drei Histidinkinasen KinA, KinB und KinC. Zum anderen besitzt es ein erhöhtes Potential zur regulatorischen Kontrolle gegenüber dem klassischen Zwei-Komponenten-System, etwa durch transkriptionelle Regulierung der einzelnen Bestandteile des Signalweges (Appleby *et al.*, 1996). Der Kin/Spo0-Phosphorelay wird zudem



durch eine Reihe spezifischer Phosphatasen reguliert. Spo0L und Spo0P dephosphorylieren Phospho-Spo0F, den ersten Regulator (Perego, 1994; Hoch, 1995), während Spo0E eine spezifische Phosphatase für den zweiten Regulator Spo0A darstellt (Ohlsen *et al.*, 1994). Vielfach findet man eine kovalente Verknüpfung einzelner Module, etwa im BvgS/BvgA-Phosphorelay in *Bordetella pertussis*, bei dem die ersten drei Module in BvgS vereint sind (Abb. 2-3, Uhl und Miller, 1996). Diese Verknüpfung dient vermutlich einer erhöhten Effizienz der Signalweiterleitung und der Vermeidung unspezifischen Crosstalks (Appleby *et al.*, 1996).



**Abbildung 2-3**

Schematische Darstellung der Signaltransduktion im Phosphorelay. Die Phosphorylgruppe der Histidinkinase (H1) wird über einen Regulator (D1) und ein Histidin-Phosphotransferprotein (HPT-Protein, H2) auf einen zweiten Regulator (D2) übertragen. Diese vier Module können als unabhängige Proteine vorliegen wie im Fall des Kin/Spo0-Phosphorelays in *B. subtilis*, es treten jedoch auch häufig Hybridproteine auf wie etwa im BvgS/BvgA-Phosphorelay aus *B. pertussis* oder der Sln1/Ypd1/Ssk1/Skn7-Phosphorelay in *S. cerevisiae*. In diesem Fall wie auch im Kin/Spo0-Signalweg wird durch unterschiedliche Regulatoren bzw. Kinasen eine Signalintegration bzw. -verzweigung gewährleistet.

Homologe zu Proteinen der Zwei-Komponenten-Signaltransduktion wurden in den letzten Jahren auch in Eukaryoten wie Pilzen, Amöben und Pflanzen entdeckt (Ota und Varshavsky, 1993; Chang *et al.*, 1993; Alex *et al.*, 1996; Schuster *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Kakimoto, 1996; Alex *et al.*, 1998; Zinda und Singleton, 1998; Urao *et al.*, 1999) und die Histidinkinase-Aktivität der entsprechenden Proteine sowohl *in vitro* als auch *in vivo* demonstriert (Posas *et al.*, 1996; Gamble *et al.*, 1998). Vielfach handelt es sich auch hier um Komponenten eines mehrstufigen Phosphorelays, so auch bei dem Sln1-Ypd1-Ssk1/Skn7-Phosphorelay aus *Saccharomyces cerevisiae*, der eine wichtige Rolle in der zellulären Reaktion auf hyperosmotischen und oxidativen Stress spielt (Wurgler-Murphy und Saito, 1997; Li *et al.*, 1998). Eine Hybridhistidinkinase, Sln1, bestehend aus H1- und D1-Modul, überträgt die Phosphorylgruppe auf das HPT-Protein Ypd1, von dem sie schließlich auf einen der beiden Regulatoren Ssk1 und Skn7 gelangt (Abb. 2-3).

## 1.4 Mechanismen der Osmoregulation

### 1.4.1 Osmotischer Druck und Tonizität

Eine in Mikroorganismen und Pflanzen häufig durch Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme detektierte Variable ist das Wasser-Potential des die Zellen umgebenden Mediums (Posas *et al.*, 1996; Schuster *et al.*, 1996; Wurgler-Murphy und Saito, 1997; Urao *et al.*, 1999). Das Wasser-Potential setzt sich in Lösung aus dem hydrostatischen Druck  $P$ , dem Gravitationsdruck  $G$  und dem osmotischen Druck  $\pi$  wie folgt zusammen<sup>1</sup> (Yancey *et al.*, 1982):

---

<sup>1</sup> In Lösung entfällt das Matrixpotential  $\chi$ , das die im natürlichen System auftretenden Kapillarkräfte und das Quellverhalten des Bodens berücksichtigt und damit das Wasserpotential erheblich herabsetzen kann (Adam *et al.*, 1988).

$$= - \quad + P + G$$

Gleichung 2

Bei Mikroorganismen wie *D. discoideum* spielen Veränderungen von Gravitations- und hydrostatischem Druck in ihrem natürlichen Habitat keine Rolle, so dass das Wasser-Potential allein vom osmotischen Druck abhängt. Unter osmotischem Druck versteht man den Druck, den Lösungsmittelmoleküle, die in ein durch eine semipermeable Membran getrenntes Kompartiment (etwa eine Zelle mit der sie umgebenden Plasmamembran) hineindiffundieren, auf die Wand des Kompartiments ausüben (Sauermost, 1994). Nach van't Hoff ergibt sich für ideale Lösungen somit

$$= - \quad = R T \quad c_s$$

Gleichung 3

mit der allgemeinen Gaskonstante  $R$ , der in erster Näherung konstanten Temperatur  $T$  und der Osmolarität der Lösung  $c_s$ , der Summe der molaren Konzentrationen aller gelösten, osmotisch aktiven Teilchen (Osmolyte) in der Lösung (Blomberg und Adler, 1992; Adam *et al.*, 1988). Die Veränderung dieses Drucks bewirkt das Schwellen bzw. Schrumpfen einer Zelle, wenn keine Kraft entgegenwirkt. Hiervon leitet sich das Konzept der Tonizität einer Lösung ab, die definiert ist als das Vermögen, das Schwellen oder Schrumpfen von Zellen zu induzieren (Baumgarten und Feher, 1995). In isotonen Lösungen bleibt der Wassergehalt einer Zelle und somit ihr Volumen konstant; eine hypertonische Umgebung führt zum Ausfluss von Wasser aus der Zelle, was eine Abnahme des Zellvolumens bewirkt (Baumgarten und Feher, 1995).

Eine Veränderung der Osmolarität, etwa eine Zunahme aufgrund von Trockenheit oder von Temperaturen unterhalb des Gefrierpunkts, tritt in der Natur häufig auf und kann bei starken Veränderungen zu osmotischen Stress-Situationen führen (Yancey *et al.*, 1982). Um diesem Druck entgegenzuwirken und das ursprüngliche Zellvolumen wiederherzustellen, entwickelten Zellen eine Reihe von Mechanismen, die als regulatorische Volumenzunahme (RVI), bzw. nach dem Schwellen in hypotonischem Medium als regulatorische Volumenabnahme (RVD) bezeichnet

werden (Kwon und Handler, 1995). Sie umfassen den Transport von Ionen wie  $K^+$  und  $Cl^-$ , von organischen Osmolyten und die Synthese von Osmolyten (Baumgarten und Feher, 1995). Diese kleinen organischen Verbindungen werden als "kompatible Osmolyte" bezeichnet, da sie im Gegensatz zu Ionen wie  $K^+$ , die einen negativen Effekt auf Aktivität und Stabilität vieler Proteine ausüben (Yancey *et al.*, 1982), enzymatische Reaktionen meist nicht beeinflussen und native Proteinkonformationen stabilisieren (Blomberg und Adler, 1992). Diese kompatiblen Osmolyte umfassen Polyole (z.B. Glycerin, Sorbit), Aminosäuren und ihre Derivate (z.B. Glutamat, Taurin), Kohlenhydrate (z.B. Trehalose), Harnstoff, Methylamin-Derivate und Glycin.

### 1.1.2 Osmoregulation in *D. discoideum*

Im einzelligen Stadium ist die zellwandlose Amöbe *D. discoideum* häufigen Veränderungen der Osmolarität ausgesetzt. Bei einem hyperosmotischen Schock von 400 mM Sorbit schrumpfen die Zellen innerhalb von zwei Minuten auf etwa die Hälfte ihres ursprünglichen Volumens (Pintsch *et al.*, eingereicht) und bewahren dieses Volumen solange die hypertonen Bedingungen vorliegen (Zischka *et al.*, 1999). In hypertonen Lösungen geringerer Osmolytkonzentration wird ebenfalls eine Abnahme auf ca. 50 % des Ausgangsvolumen gemessen, allein die Kinetik der Volumenreduktion ist vom osmotischen Druck abhängig (Oyama und Kubota, 1997). Es wurden weder compatible Osmolyte (Oehme, 1999) noch andere Mechanismen zur regulatorischen Volumenzunahme bei hyperosmotischem Stress in diesem Organismus beobachtet (Zischka *et al.*, 1999). *D. discoideum*-Zellen haben jedoch eine Reihe anderer Mechanismen entwickelt, sich an derartige Stressbedingungen anzupassen. In erster Linie findet eine massive Umstrukturierung des Cytoskeletts statt: Hyperosmotische Bedingungen bewirken die Rearrangierung des Actomyosin-Cytoskeletts, wobei eine vermehrte Anlagerung sowohl von Myosin II als auch von Actin im Zellcortex beobachtet wird (Kuwayama *et al.*, 1996; Rivero *et al.*, 1996). Dies bewirkt eine Verstärkung des Zellcortex zu einer schalenartigen Struktur unterhalb der Plasmamembran (Insall,

1996). Diese Rearrangierung des Cytoskeletts wird von der Phosphorylierung wesentlicher Komponenten begleitet. Sowohl Actin als auch das Actin-bindende Protein Hisactophilin werden unter hyperosmotischem Stress mit einer vergleichbaren Kinetik phosphoryliert (Pintsch, 2000). Am besten verstanden ist die Phosphorylierung von Myosin II. Bei hyperosmotischem Stress steigt die cGMP-Konzentration, wodurch die Myosin-II-schwere-Kette-Kinase aktiviert und die Myosin-II-schwere-Kette an Threonin-Resten am C-Terminus transient phosphoryliert wird (Kuwayama *et al.*, 1996). Dies begünstigt die Disassemblierung der Myosin-Filamente (Tan *et al.*, 1992), die Myosin-Dimere können sich umarrangieren und verstärkt am Zellcortex anlagern. Diese Verstärkung zu einer “de facto-Zellwand” und die dabei beobachtete Abrundung der Zellen ermöglichen es, dem äußeren Druck entgegenzuwirken (Insall, 1996).

### **1.5 Das Hybrid-Histidinkinase-Homolog Doka**

An der Osmoregulation in *D. discoideum* ist auch das Hybridhistidinkinase-Homolog Doka (*Dictyostelium* osmosensing kinase A) beteiligt, das für das Überleben unter hyperosmotischen Bedingungen essentiell ist (Schuster *et al.*, 1996). Die *doka*-Deletionsmutante weist nach zwei Stunden in 400 mM Sorbitlösung (entspricht 430 mOsm) eine Überlebensrate von nur 5-10 % der Zellen auf, während Wildtyp-Zellen diese Bedingungen zu etwa 95 % überleben. Das 5010 bp große *doka*-Gen enthält keine Introns und codiert für ein 186 kD-Protein (vgl. Abb. 3-6 A). Neben einem N-terminalen Bereich ohne Homologie zu anderen Proteinen (aufgrund der Analogie zu anderen Histidin-Kinasen hier als Input-Domäne bezeichnet) finden sich zwei PAS-Domänen (F786-T881 und G928-S1027), eine Histidinkinase-Domäne (Q1046-K1273) und eine C-terminale Regulator-Domäne (Y1519-T1628, Domänengrenzen nach PRODOM (Sonnhammer und Kahn, 1994; Corpet *et al.*, 1999)). Kinase- und Regulator-Domäne besitzen alle in funktionellen Homologen konservierten Regionen. Von besonderer Bedeutung sind hierbei der konservierte Histidinrest H1053, an dem die Autophosphorylierung der Kinase stattfinden sollte, und der

Aspartylrest D1567 in der Regulator-Domäne. Auf diese Seitenkette sollte, gemäß dem Mechanismus der Zwei-Komponenten-Signalübertragung, die Phosphorylgruppe von H1053 übertragen werden.

DokA ist neben seiner Rolle in der Osmoregulation auch in der Entwicklung von *D. discoideum* von Bedeutung. *dokA* mRNA wird in vegetativ wachsenden Zellen und in den ersten 15 h der Entwicklung schwach, in der Kulminationsphase jedoch verstärkt exprimiert (Schuster *et al.*, 1996). Der terminal differenzierte Fruchtkörper von *dokA*-Zellen weist einen weitgehend transparenten Sporenkopf auf, der nur wenige Sporen enthält. Da in der Phase erhöhter *dokA*-Expression die Differenzierung von Prä-Sporenzellen zu reifen Sporen stattfindet, wird vermutet, dass DokA auch an diesem Prozess beteiligt ist.

## **1.6 Ziel der Arbeit**

Die Differenzierung zu Sporen wie die gesamte Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* ist in hohem Maße cAMP-abhängig. Die steigende Osmolarität und die verstärkte *dokA*-Expression im Zuge der Sporulation, veranlassten uns, eine mögliche Verbindung zwischen cAMP-regulierenden bzw. cAMP-regulierten Signalwegen und der DokA-abhängigen Osmoregulation zu untersuchen. Dieser Ansatz sollte dazu beitragen, die Rolle von DokA im Rahm der hyperosmotischen Stressantwort von *D. discoideum* und des Überlebens unter diesen Bedingungen aufzuklären. Das Verständnis osmoregulatorischer Signalwege in einem Modellorganismus, der im Vergleich zu Hefe eine höhere Analogie hinsichtlich Struktur und Erscheinung zu Säugerzellen aufweist, könnte auch Rückschlüsse auf diese erlauben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Rolle von cAMP im hyperosmotischen Stress

#### 3.1.1 Hyperosmotischer Stress bewirkt in *D. discoideum* eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration

cAMP ist der zentrale Botenstoff in der Entwicklung von *D. discoideum* (Verkerke-van Wijk und Schaap, 1997). Um die Rolle dieses Botenstoffs bei hyperosmotischem Stress näher untersuchen zu können, muss zwischen extrazellulärem cAMP und seiner Rolle als Hormon auf der einen Seite und intrazellulärem cAMP als Mediator in der zellinternen Signalübertragung auf der anderen Seite unterschieden werden. Dabei beeinflussen sich diese beiden cAMP-Pools stets gegenseitig: Das gesamte cAMP wird im Cytosol synthetisiert, ein Teil verbleibt in der Zelle, der andere Teil wird auf einem nicht näher charakterisierten Weg sezerniert. Dieses extrazelluläre cAMP kann wiederum über G-Protein-gekoppelte cAMP-Rezeptoren die ACA aktivieren. Die Regulation der extrazellulären cAMP-Konzentration erfolgt zusätzlich über eine extrazelluläre Phosphodiesterase, die sowohl in einer löslichen als auch in einer membranständigen Form vorliegt (Malchow *et al.*, 1972; Gerisch, 1976).

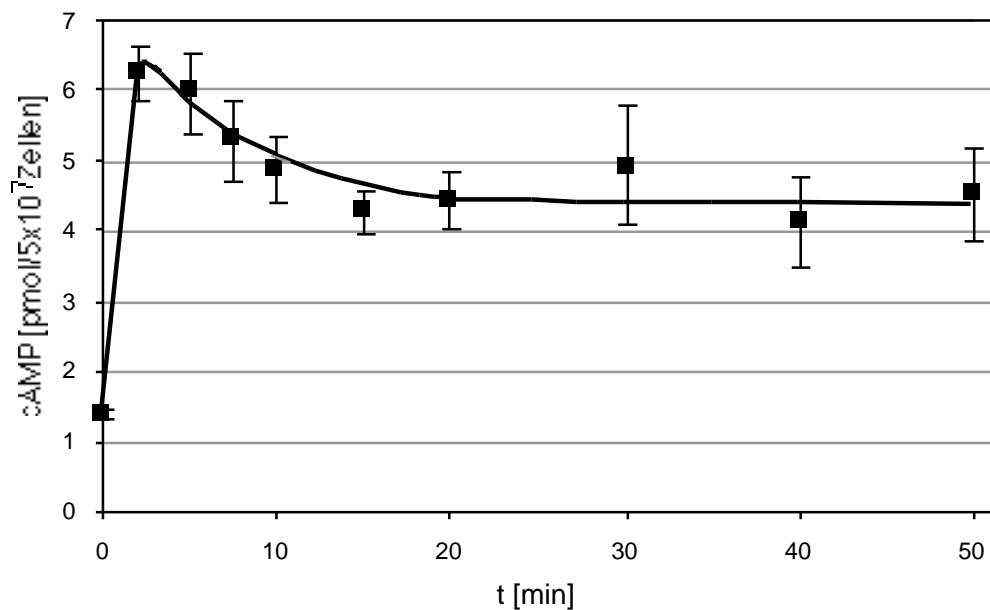
Zur Ermittlung der intrazellulären cAMP-Konzentrationen bei hyperosmotischem Stress war deshalb darauf zu achten, daß der Einfluss durch Eingriffe in die Konzentration an extrazellulärem cAMP gering blieb. Hierzu wurde die unter 5.2.12 genauer beschriebene Methode entwickelt. Zur raschen quantitativen Abtrennung der Zellen wurden diese bei 4000 *g* zentrifugiert. Die lichtmikroskopische Untersuchung der resuspendierten Zellen zeigte trotz dieser hohen Beschleunigung keine sichtbare Zerstörung der Zellen. Das sofortige Resuspendieren des

Zellpellets in eiskalter 3,5 %iger  $\text{HClO}_4$  sollte gewährleisten, dass die Proteine rasch denaturieren und dass das bei der damit einhergehenden Lyse der Zellen freiwerdende cAMP somit vor Degradation durch die extrazelluläre Phosphodiesterase geschützt ist. Anschließend wurde das Lysat mit gesättigter  $\text{KHCO}_3$ -Lösung neutralisiert, wobei auch die Ionenkonzentration durch das Entweichen von  $\text{CO}_2$  und das Fällen des Perchlorats als Kaliumsalz gesenkt wurde. Die Bestimmung der cAMP-Konzentration erfolgte unter Verwendung des Biotrak cAMP Isotopenverdünnungs-Assays. Dabei wurde jedoch das vierfache Probevolumen eingesetzt, wodurch die Sensitivität und Zuverlässigkeit bei geringen cAMP-Konzentrationen gesteigert werden konnte.

Für den hyperosmotischen Schock wurde das Polyol Sorbit verwendet, das durch *D. discoideum* nicht abgebaut wird (S.C. Schuster, pers. Mitteilung). Die Zellen wurden zunächst zur Synchronisierung für 60 min bei einer Dichte von  $3 \cdot 10^7$  Zellen in Soerensen-Phosphatpuffer (SPB) geschüttelt. Durch die Zugabe von Sorbit (Endkonzentration 400 mM) wurde die Osmolalität im Schock von 34 mOsm auf 430 mOsm erhöht.

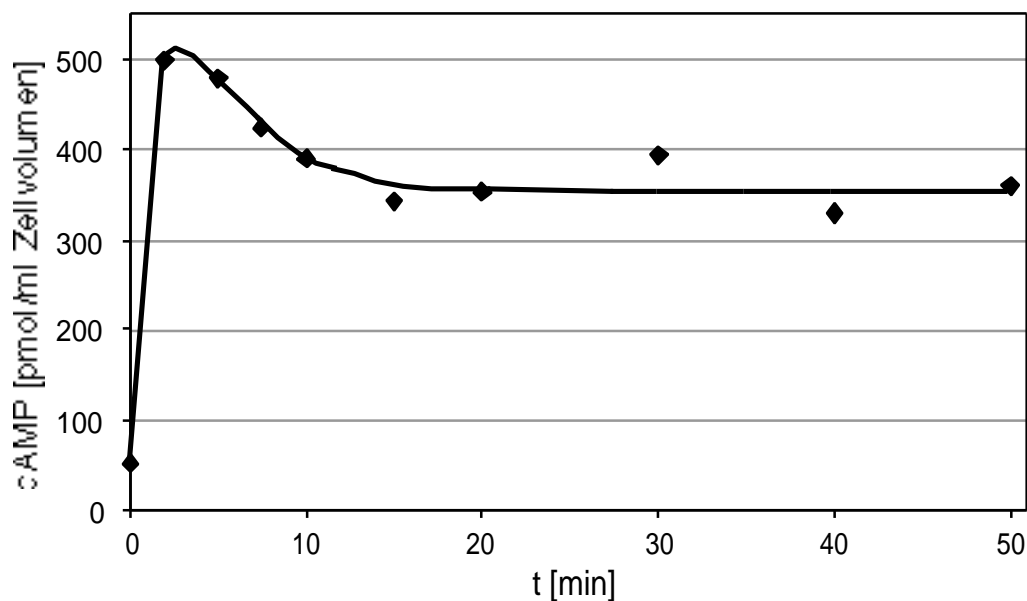
Die Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration unter diesen Bedingungen ergab, dass die cAMP-Menge in Ax2-Zellen durch den hyperosmotischen Schock auf den 4-5-fachen Wert anstieg, nach Erreichen dieses Maximums bei  $t = 2$  min jedoch wieder abnahm (Abb. 3-1). Diese Abnahme der cAMP-Konzentration erfolgte deutlich langsamer. Nach 15 min unter hyperosmotischen Bedingungen erreichte die intrazelluläre cAMP-Konzentration in Ax2-Zellen einen Wert von etwa  $4,5 \text{ pmol} / 5 \cdot 10^7$  Zellen, der sich in den folgenden 35 min nicht signifikant veränderte. Diese Konzentration lag deutlich über der unmittelbar vor dem Schock ermittelten Basalkonzentration von  $1,3 \text{ pmol cAMP} / 5 \cdot 10^7$  Zellen.



**Abbildung 3-1**

Verlauf der intrazellulären cAMP-Konzentration in Ax2-Zellen bei hyperosmotischem Stress. Die dargestellten Daten sind das Mittel aus den Werten dreier unabhängiger Messreihen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte.

Die Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration wird noch deutlicher, wenn man berücksichtigt, dass das Zellvolumen durch den osmotischen Druck auf weniger als die Hälfte abnimmt (Zischka *et al.*, 1999). Dieser Schrumpfungsprozess ist nach etwa 2 min abgeschlossen (Pintsch, 2000) und die Zelle bewahrt dieses verringerte Volumen solange die hyperosmotischen Bedingungen anhalten (Zischka *et al.*, 1999). Berücksichtigt man diese Kontraktion und legt ein Zellvolumen von 520 fl (Klein und Satre, 1986) für die ungeschockten Zellen zu Grunde, so ergibt sich der in Abb. 3-2 dargestellte Verlauf der cAMP-Konzentration im Osmostress.



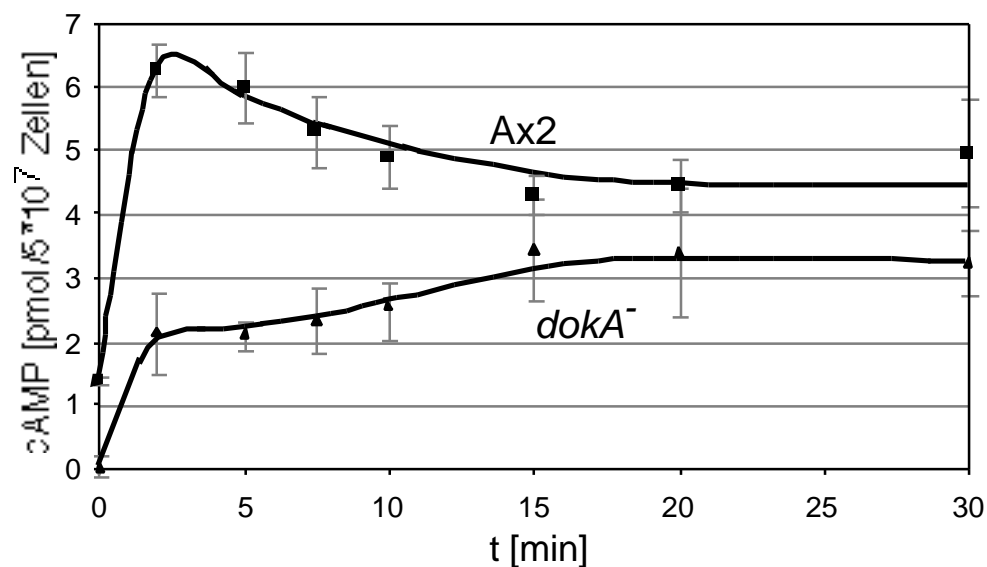
**Abbildung 3-2**

Verlauf der intrazellulären cAMP-Konzentration in Ax2-Zellen bei hyperosmotischem Stress. Die Werte entsprechen den in Abb. 3-1 dargestellten, sie wurden allerdings auf das Zellvolumen zum jeweiligen Zeitpunkt (nach Klein und Satre, 1986; Pintsch, 2000) normiert.

### 3.1.2 *dokA*-Zellen weisen eine verringerte intrazelluläre cAMP-Konzentration auf

Ax2-Zellen überleben einen hyperosmotischen Stress von 2 h in 400 mM Sorbit in SPB nahezu vollzählig (Schuster *et al.*, 1996). Dagegen weisen M2-1-Zellen (Ax2:*dokA*), bei denen das Gen für das Hybridhistidinkinase-Homolog DokA durch homologe Rekombination deletiert wurde, unter diesen Bedingungen nur eine Überlebensrate von 5-10 % auf. Diese Osmosensitivität war Veranlassung, den Verlauf der cAMP-Konzentration in *dokA*-Zellen unter hyperosmotischen Bedingungen zu untersuchen. Abb. 3-3 zeigt die Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration von M2-1-Zellen im Vergleich zum Wildtyp. Die cAMP-Konzentration in der Mutante lag vor dem Schock unterhalb der Nachweisgrenze des cAMP-Assays und damit deutlich niedriger als in Ax2-Zellen. Durch den hyperosmotischen Schock konnte auch in der *dokA*-Mutante ein Anstieg der cAMP-Konzentration beobachtet werden. Dieser Anstieg war jedoch geringer als in Wildtypzellen und zeigte kein Maximum nach wenigen Minuten, stattdessen zeigte

sich ein Konzentrationsverlauf, der einer Sättigungskurve ähnelt. Nach 15 min wurde ein Wert von etwa 3-3,5 pmol cAMP/  $5 \cdot 10^7$  Zellen erreicht, der im weiteren Verlauf konstant blieb und damit ebenso wie vor dem hyperosmotischen Schock um ca. 1 pmol unterhalb der für Ax2-Zellen ermittelten Werte lag.



**Abbildung 3-3**

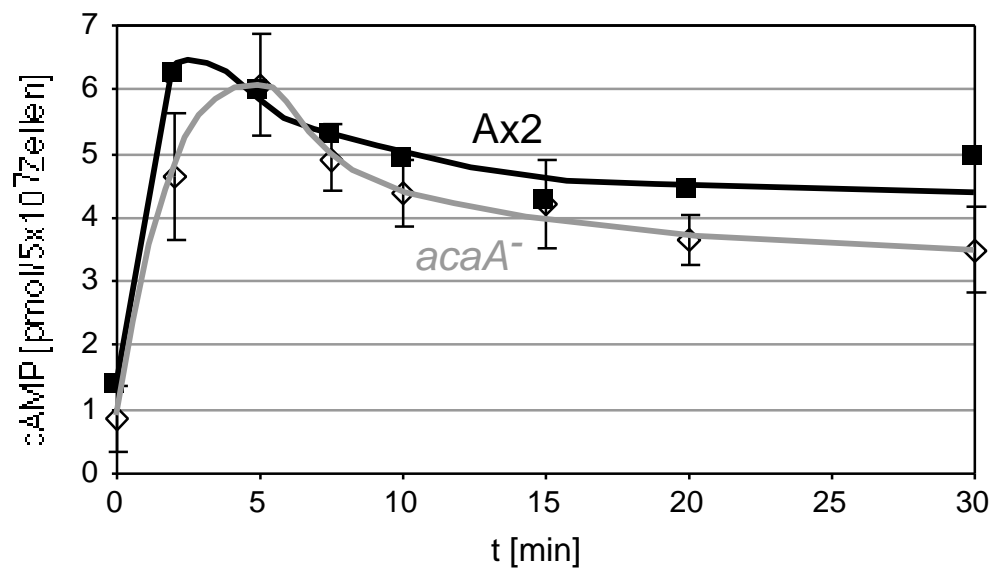
Intrazelluläre cAMP-Konzentration in *doka*<sup>-</sup>-Zellen (Dreiecke) bei hyperosmotischem Stress im Vergleich zu Wildtypzellen. Die cAMP-Konzentration in *doka*<sup>-</sup>-Zellen ist im gesamten Verlauf deutlich geringer, bei  $t = 0$  lag sie unterhalb der Nachweisgrenze. Die größte Differenz ist in den ersten 10 min zu beobachten. Die dargestellten Daten sind das Mittel aus den Werten dreier unabhängiger Messreihen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte.

Lichtmikroskopische Kontrollen ergaben, dass die osmosensitiven *doka*<sup>-</sup>-Zellen ebenso wie Wildtypzellen während der gesamten Untersuchung morphologisch intakt blieben. Damit konnte eine osmotisch bedingte Lyse der Zellen als Ursache für den veränderten Verlauf der cAMP-Konzentration ausgeschlossen werden.

### 3.1.3 Die Änderung der cAMP-Konzentration in *acaA*-Zellen ähnelt dem Verlauf in Wildtypzellen

Der in Wildtypzellen beobachtete starke Anstieg der cAMP-Konzentration bei hyperosmotischem Stress wirft die Frage auf, wie diese Zunahme erreicht wird. In *D. discoideum* sind drei Adenylatzyklen bekannt: die lediglich in Sporen exprimierte ACG (van Es *et al.*, 1996), die ACA, die für die Aggregation in der Entwicklung essentiell ist (Pitt *et al.*, 1992) und die erst vor kurzem entdeckte Adenylatzyklase ACB bzw. AcrA (Kim *et al.*, 1998; Soderbom *et al.*, 1999). Da die ACG aufgrund ihres Expressionsmusters nicht in Betracht kam, wurde zunächst untersucht, ob eine Aktivierung der ACA den unter hyperosmotischem Stress beobachteten cAMP-Anstieg bewirkt.

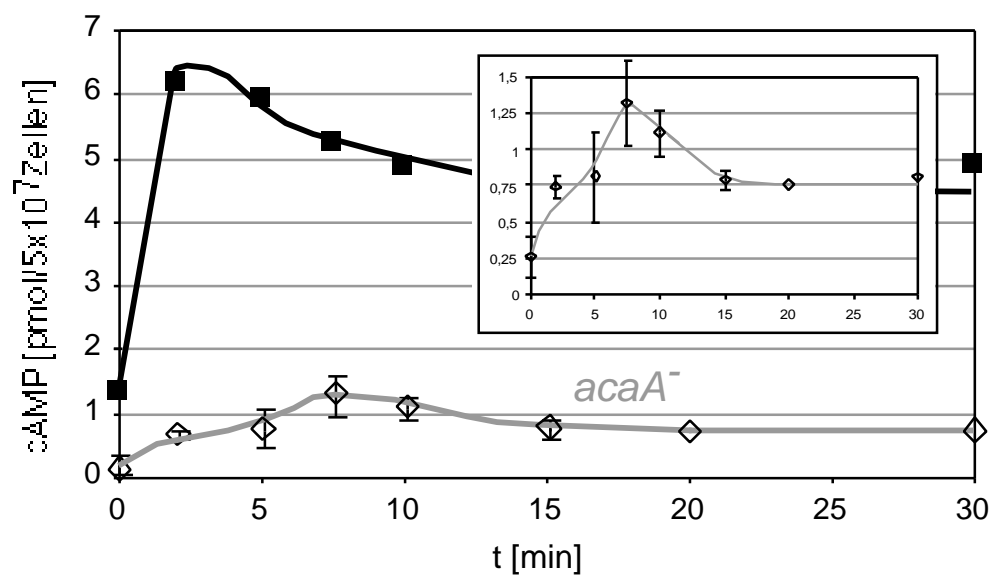
Hierfür wurden CAP I-Zellen (DH1:*acaA*) osmotisch geschockt und die Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration gemessen. Wie Abb. 3-4 zeigt, unterschied sich der Verlauf der cAMP-Konzentration in *acaA*-Zellen nur geringfügig von dem in Ax2-Zellen. Der durch den hyperosmotischen Schock bedingte Anstieg war etwas verlangsamt und die Werte lagen  $0,3 - 1 \text{ pmol} / 5 \cdot 10^7 \text{ Zellen}$  unterhalb der für Ax2-Zellen ermittelten cAMP-Konzentrationen. Qualitativ wurde jedoch der gleiche Verlauf mit einem Maximum nach wenigen Minuten und einer anschließenden geringen Abnahme der Konzentration beobachtet. Somit konnte eine Aktivierung der ACA als Ursache der Zunahme der cAMP-Konzentration im Osmostress ausgeschlossen werden. Darauf deuten auch Ergebnisse hin, die eine Abnahme der Aktivität von ACA bei erhöhter Tonizität *in vitro* zeigen (Meima und Schaap, 1999). Auch die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der cAMP-Produktion in der Entwicklung von *D. discoideum*, die auf ACA zurückzuführen ist, wird durch eine Erhöhung der Osmolarität verringert (Darmon und Klein, 1978).



**Abbildung 3-4**

Intrazelluläre cAMP-Konzentration in *acaA*<sup>-</sup>-Zellen (offene Rauten) bei hyperosmotischem Stress im Vergleich zu Wildtypzellen. Der Verlauf der cAMP-Konzentration in beiden Zelllinien unterscheidet sich nur geringfügig. Die dargestellten Daten sind das Mittel aus den Werten dreier unabhängiger Messreihen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte von *acaA*<sup>-</sup>-Zellen

Die Änderung der cAMP-Konzentration unter hyperosmotischen Bedingungen wurde auch bei der *acrA*<sup>-</sup>-Mutante DG1100 (Ax4:*acrA*) untersucht. Dabei wurde während der gesamten Messung eine deutlich geringere cAMP-Konzentration festgestellt (Abb. 3-5). Die qualitative Änderung der cAMP-Konzentration ähnelte jedoch dem für Ax2-Zellen ermittelten Verlauf. Auch dieser Stamm reagiert auf hyperosmotische Bedingungen mit einem Anstieg des cAMP-Spiegels. AcrA ist offenbar Hauptproduzent, aber nicht die einzige cAMP-Quelle unter diesen Versuchsbedingungen. Im Gegensatz dazu konnte in der Doppelmutante TAM (DH1:*acaA acrA*) zu keinem Zeitpunkt der Messung cAMP nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass beide Adenylatzyklen, ACA und AcrA, unter den gegebenen Bedingungen zur cAMP-Synthese beitragen. Da jedoch in beiden Einzelmутanten (in *acaA*<sup>-</sup>- und in *acrA*<sup>-</sup>-Zellen) sowohl ein Anstieg als auch der anschließende Rückgang der intrazellulären cAMP-Konzentration zu beobachten war, erfolgte die Regulierung des cAMP-Spiegel offenbar nicht über die Adenylatzyklen.

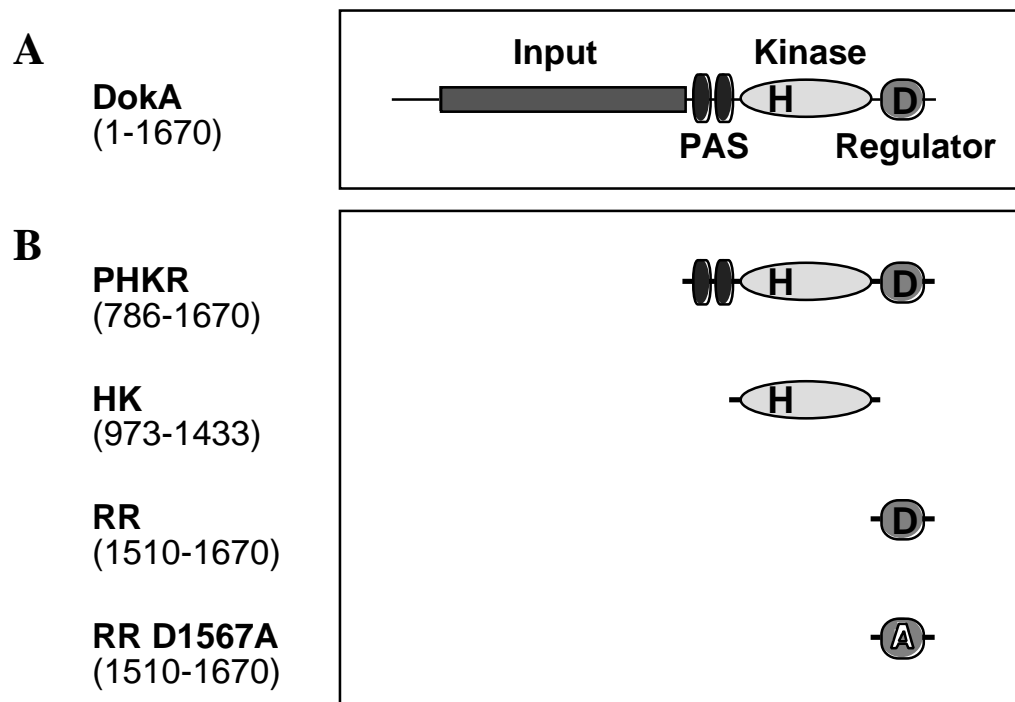


**Abbildung 3-5**

Intrazelluläre cAMP-Konzentration in *acrA*<sup>-</sup>-Zellen (offene Rauten) bei hyperosmotischem Stress im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Der veränderte Maßstab im eingeklinkten Graphen zeigt, dass der Kurvenverlauf auch in diesem Stamm Ähnlichkeiten mit dem Verlauf bei Wildtypzellen aufweist. Neben der erheblich geringeren cAMP-Konzentration ist jedoch auch der Anstieg der cAMP-Konzentration deutlich verlangsamt. Die dargestellten Daten sind das Mittel aus den Werten dreier unabhängiger Messreihen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte von *acrA*<sup>-</sup>-Zellen. Für t = 20 bzw. 30 min lagen nur zwei Messwerte vor, weshalb hier auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet wurde.

### 3.1.4 Die cAMP-Änderung im Osmostress bei Überexpression von DokA-Domänen

Um ein besseres Verständnis der Rolle von DokA in der cAMP-Regulation zu gewinnen, wurden einzelne Domänen dieses Proteins homolog überexprimiert (Oehme, 1999). Die Domänenstruktur von DokA ist in Abb. 3-6 A dargestellt. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass man die Kinase- und Regulator-Domänen von Hybridproteinen der Zwei-Komponenten-Systeme einzeln exprimieren kann, ohne dass dabei ihre Funktion verloren geht (Swanson, 1993; Posas *et al.*, 1996; Gamble *et al.*, 1998). Die Stämme, die die jeweiligen Domänen unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Aktin-15-Promotors exprimierten, wurden entsprechend dieser Domänen benannt (Abb. 3-6 B, Oehme, 1999).

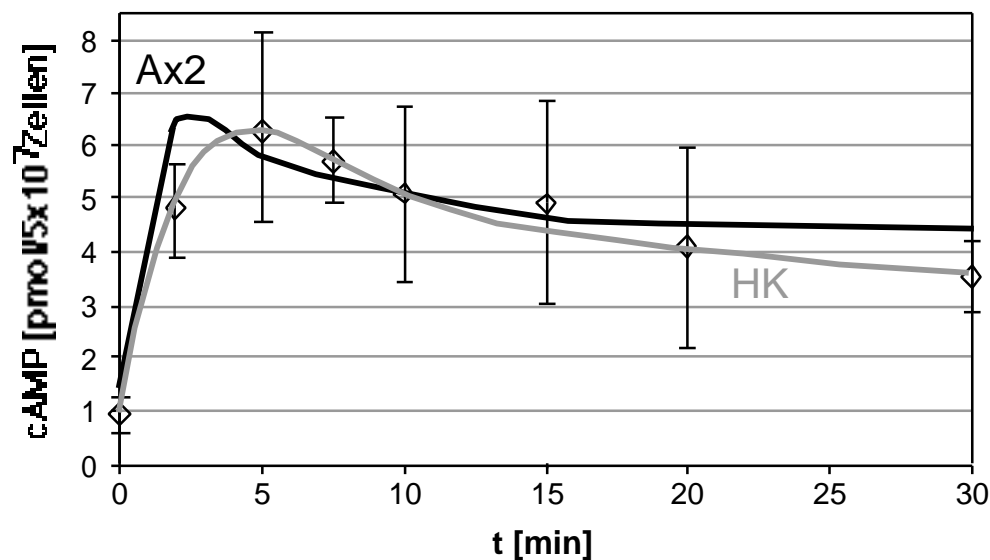
**Abbildung 3-6**

(A) *dokA* codiert für ein Homolog einer Hybridhistidinkinase mit einem Molekulargewicht von 186 kD. Es besteht aus einer N-terminalen Domäne, die keinerlei signifikante Sequenzhomologie zu anderen Proteinen oder Proteindomänen aufweist, zwei PAS-Domänen, einer Histidinkinase-Domäne und einer C-terminalen Regulator-Domäne. Die Domänen wurden anhand eines Sequenzvergleichs mit anderen Zwei-Komponenten-Signalübertragungsmodulen ermittelt. Die konservierten Aminosäurereste H1053 und D1567 sind hervorgehoben. Sie entsprechen den Resten, die im Zuge der Zwei-Komponenten-Signaltransduktion phosphoryliert werden.

(B) Die drei Konstrukte PHKR, HK und RR und die Teilbereiche von DokA für die sie codieren, sowie das mutierte Fragment RRDA. Diese Konstrukte wurden unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Aktin-15-Promotors in *D. discoideum* in löslicher Form exprimiert.

Die intrazellulären cAMP-Bestimmungen in diesen Stämmen zeigten, dass die Überexpression der Kinase-Domäne HK keine wesentliche Veränderung im Verlauf der cAMP-Konzentration im Osmostress gegenüber Ax2-Zellen bewirkte (Abb. 3-7). Deutliche Unterschiede zeigten sich jedoch bei der Überexpression der Regulator-Domäne (Abb. 3-8). Die Zellen wiesen eine deutlich erhöhte Basalkonzentration an cAMP auf. Auf diesem Niveau war unter hyperosmotischem Stress

ein weiterer Anstieg bis zu einer Maximalkonzentration von etwa 11 pmol cAMP/  $5 \cdot 10^7$  Zellen zu beobachten. Die qualitative Änderung der cAMP-Konzentration ähnelte auch in RR-Zellen dem in Wildtypzellen beobachteten Verlauf, die Abnahme der Konzentration war jedoch deutlich stärker, wodurch nach 30 min in hypertotonischer Umgebung nahezu die Wildtypkonzentration an cAMP gemessen wurde.



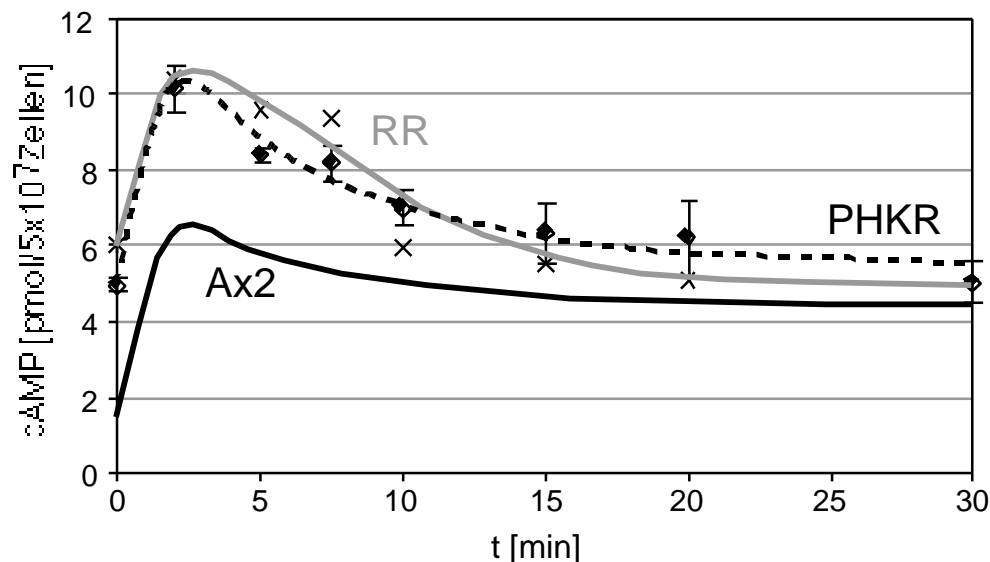
**Abbildung 3-7**

Intrazelluläre cAMP-Konzentration in HK-Zellen (offene Rauten) bei hyperosmotischem Stress im Vergleich zu Wildtypzellen. Abgesehen von einem etwas verzögerten Anstieg der cAMP-Konzentration ist kein Einfluss durch die Überexpression der Kinase-Domäne festzustellen. Die dargestellten Daten sind das Mittel aus den Werten dreier unabhängiger Messreihen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte von HK-Zellen.

Die Entwicklung der intrazellulären cAMP-Konzentration im Osmostress von RR-exprimierenden Zellen glich weitgehend dem Verlauf in Zellen, die das Konstrukt PHKR, bestehend aus PAS-, Kinase- und Regulator-Domänen, konstitutiv überexprimierten (Abb. 3-8). Der erhöhte Basalwert von 5 pmol cAMP/  $5 \cdot 10^7$  Zellen im Fall von PHKR-Zellen bzw. von 6 pmol/  $5 \cdot 10^7$  Zellen in RR-Zellen scheint somit Folge der verstärkten Expression der Regulator-Domäne zu sein. Dabei



spielte es offenbar keine Rolle, ob die Regulator-Domäne allein oder in Verbindung mit der Kinase-Domäne in den Zellen exprimiert wurde.

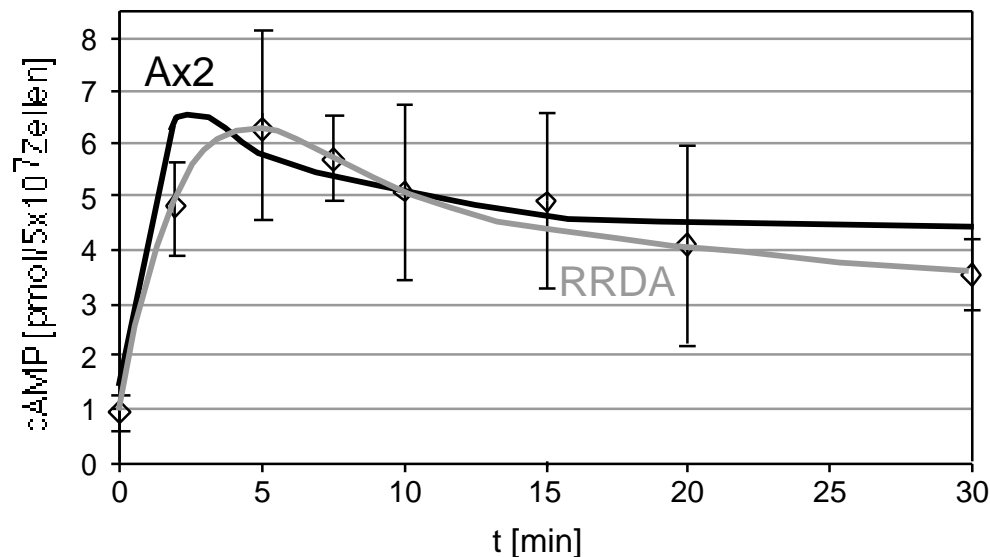


**Abbildung 3-8**

Intrazelluläre cAMP-Konzentration in PHKR-Zellen (geschlossene Rauten, gestrichelte Linie) und RR-Zellen (Kreuze, graue Linie) bei hyperosmotischem Stress im Vergleich zu Wildtypzellen. Die Überexpression der DokA-Fragmente bewirkt in beiden Fällen eine erhöhte cAMP-Basalkonzentration. Im Osmostress steigt die Konzentration in beiden Zelllinien wie in Wildtypzellen um über 4 pmol cAMP/5\*10<sup>7</sup> Zellen, sinkt anschließend jedoch stärker, so dass nach 15-30 min die basale cAMP-Konzentration der jeweiligen Zelllinie gemessen wurde, die sich nur noch geringfügig von der Konzentration in Wildtypzellen unterscheidet. Die dargestellten Daten sind das Mittel aus den Werten dreier unabhängiger Messreihen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte von PHKR-Zellen. Auf die Darstellung der Fehlerbalken der Messwerte aus RR-Zellen wurden zur besseren Übersicht verzichtet.

Ein erster Einblick in die Wirkungsweise der Regulator-Domäne von DokA ergab sich aus den cAMP-Messungen bei Zellen, die eine punktmutierte Regulator-Domäne exprimierten. In der Mutante RRDA wurde der für die Zwei-Komponenten-Signalübertragung entscheidende Rest D1567 gegen Alanin mutiert. Der cAMP-Spiegel ungeschockter Zellen, wie auch die Änderung der cAMP-Konzentration im Osmostress, ähnelte in diesen Zellen den für Ax2-Zellen ermittelten Werten (Abb. 3-9). Daran zeigt sich, dass der erhöhte cAMP-Spiegel in RR-Zellen von der

Überexpression eines funktionellen Regulators mit phosphorylierbarem Aspartylrest abhängt, der Regulator von DokA somit offenbar einen entscheidenden Einfluss auf ein Zwei-Komponenten-System besitzt, das den intrazellulären cAMP-Spiegel reguliert.



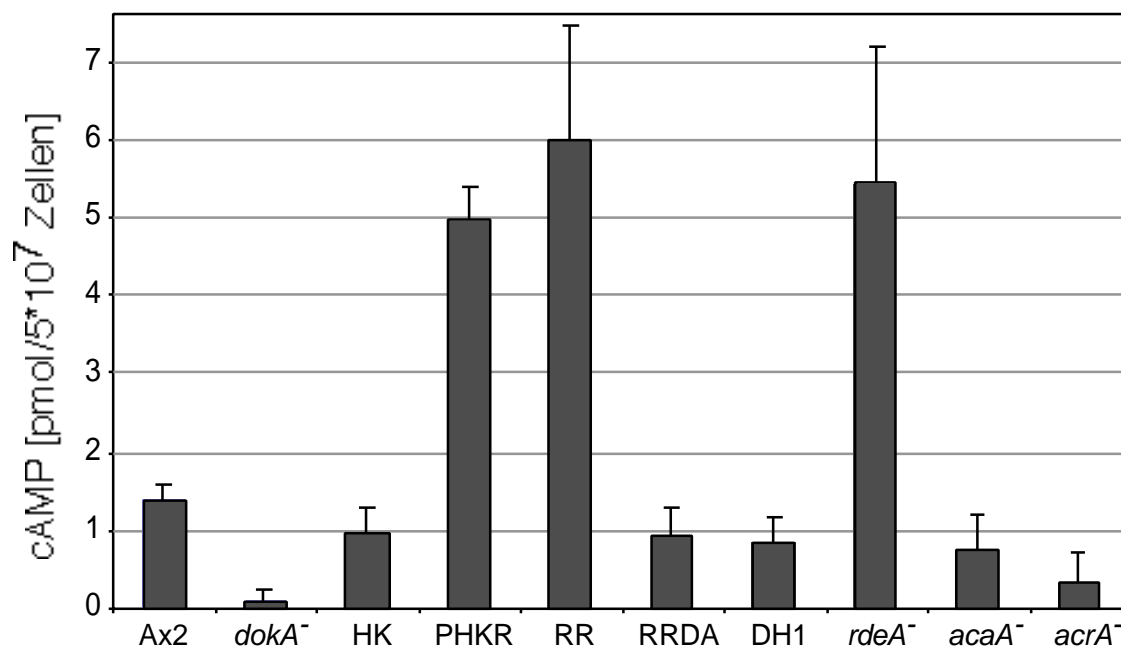
**Abbildung 3-9**

Intrazelluläre cAMP-Konzentration in RRDA-Zellen (offene Rauten) bei hyperosmotischem Stress im Vergleich zu Wildtypzellen. Die Überexpression der punktmutierten RR-Domäne bewirkt keine wesentliche Veränderung gegenüber Wildtypzellen. Der Effekt der Überexpression der RR-Domäne ist somit vom Aminosäurerest D1567 abhängig. Die dargestellten Daten sind das Mittel aus den Werten dreier unabhängiger Messreihen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte von RRDA-Zellen.

### 3.1.5 Gegenüberstellung der basalen intrazellulären cAMP-Konzentrationen

Die obigen Resultate zusammenfassend lässt sich ein klarer Trend beschreiben: Die Expression der intakten DokA-Regulator-Domäne korrelierte direkt mit der cAMP-Konzentration nach 1 h in SPB. Im *dokA*<sup>-</sup> Stamm waren die cAMP-Werte unterhalb des messbaren Bereichs; in Wildtypzellen fanden sich etwa 1,3 pmol cAMP/ 5\*10<sup>7</sup> Zellen und ein vergleichbarer Wert von 1,0 pmol cAMP/ 5\*10<sup>7</sup> Zellen wurde in Zellen gemessen, die die Kinase-Domäne allein bzw. eine mutierte Form der Regulator-Domäne im Wildtyp-Hintergrund überexprimierten (Abb. 3-10). In

beiden Fällen sollte die Expressionsrate einer funktionellen DokA-Regulator-Domäne gegenüber Ax2-Zellen unverändert sein. Wurde jedoch die intakte Regulator-Domäne überexprimiert, ob als 99 kD großes PHKR-Konstrukt oder als 18 kD große Regulator-Domäne, erhöhte sich die Konzentration an cAMP deutlich. Ein vergleichbar hohes cAMP-Niveau konnte in *rdeA*<sup>-</sup>-Zellen gefunden werden. *rdeA* codiert für ein Histidin-Phosphotransfer-Protein (HPT), das durch Phosphorylgruppenübertragung die intrazelluläre cAMP-spezifische Phosphodiesterase RegA aktiviert (Thomason *et al.*, 1998). Das Fehlen dieser Phosphotransferase blockiert somit einen entscheidenden Weg zur Aktivierung des intrazellulären cAMP-Abbaus, was einen erhöhten cAMP-Spiegel zur Folge hat.



**Abbildung 3-10**

Vergleich der basalen intrazellulären cAMP-Konzentrationen (nach 1 h in SPB). Der cAMP-Spiegel ist in *dokA*<sup>-</sup>- und *acrA*<sup>-</sup>-Zellen deutlich geringer als in Ax2-Zellen, während PHKR-, RR- und *rdeA*<sup>-</sup>-Zellen deutlich erhöhte cAMP-Konzentrationen aufweisen. DH1 ist der Ausgangsstamm von *rdeA*<sup>-</sup>- und *acaA*<sup>-</sup>-Zellen. Der cAMP-Spiegel ist in DH1-Zellen etwas niedriger als bei Ax2-Zellen, die Deletion von *acaA* wirkt sich in diesem Entwicklungsstadium somit nicht merklich aus. Die Werte sind das Mittel von je drei bis vier Messproben aus mindestens drei unabhängigen Zellpräparationen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte.

Die Deletion von *acaA* wirkte sich in diesem Entwicklungsstadium auf die cAMP-Konzentration kaum aus, während *acrA*<sup>-</sup>-Zellen einen deutlich verringerten cAMP-Spiegel aufwiesen.

### 3.1.6 Die Gesamt-cAMP-Konzentration unter hyperosmotischem Stress

*D. discoideum* sezerniert cAMP in der Entwicklung (siehe 2.2.1). Um zu untersuchen, ob DokA an der Regulierung des cAMP-Exports beteiligt ist, wurde die Gesamt-cAMP-Konzentration in der Zellsuspension gemessen, also die Summe aus extra- und intrazellulärem cAMP. Für diese Messungen wurde die Zellsuspension mit 5 mM DTT versetzt, um die extrazelluläre Phosphodiesterase zu inhibieren (Henderson, 1975; Green und Newell, 1975). Dieses Enzym tritt in zwei Spleissvarianten auf, als membrangebundene mPDE und als sezernierte ePDE (Malchow *et al.*, 1972; Gerisch, 1976). Die Inhibierung dieser Phosphodiesterase bewirkt einen Anstieg der extrazellulären cAMP-Werte, was wiederum über die Bindung an cAMP-Rezeptoren (cAR) zu einer ACA-Aktivierung führt. Somit erhält man durch Zugabe von DTT eine kontinuierlich steigende Gesamt-cAMP-Konzentration. In diesem Hintergrund wurde 6 min nach der DTT-Zugabe die Osmolalität von 34 mOsm auf 430 mOsm erhöht. Wie Abb. 3-11 zeigt, bewirkte dieser hyperosmotische Schock einen erheblich stärkeren Anstieg der cAMP-Konzentration in einer Ax2-Zellsuspension. Somit wurde auch bei diesen Messungen ein osmotisch bedingter Anstieg der cAMP-Menge gemessen, der Anstieg im Zellinneren (siehe 3.1.1) ist also nicht auf eine Inhibierung des cAMP-Exports zurückzuführen. Die verstärkte cAMP-Produktion wurde allein durch die Hypertonizität des Mediums induziert, die kontinuierliche Steigerung im Vergleich zu ungeschockten Zellen war jedoch vermutlich auch ein Effekt der positiven Rückkopplung über sezerniertes und die cAR-Rezeptoren stimulierendes cAMP.

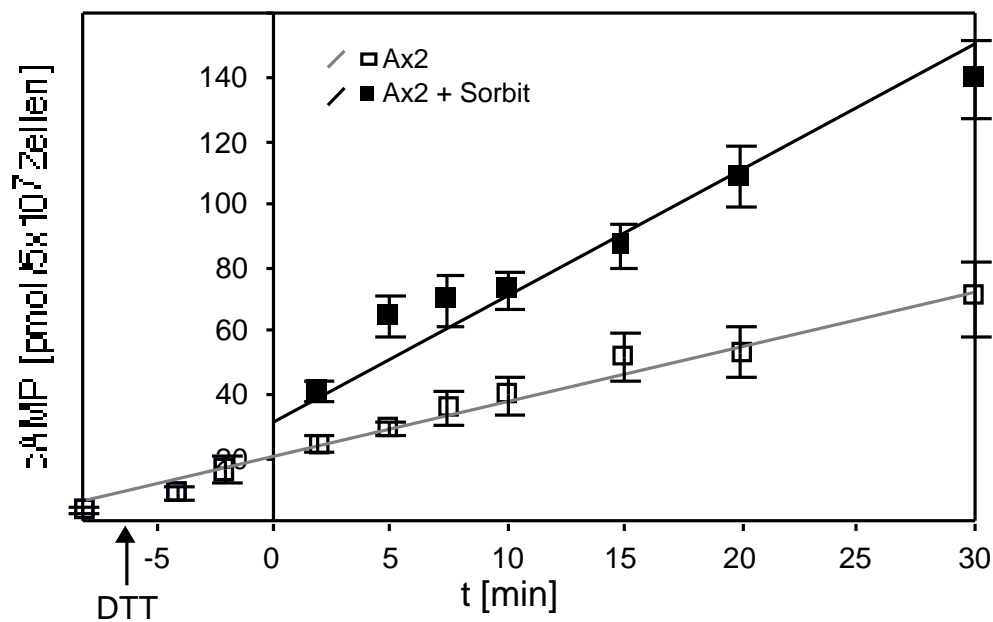


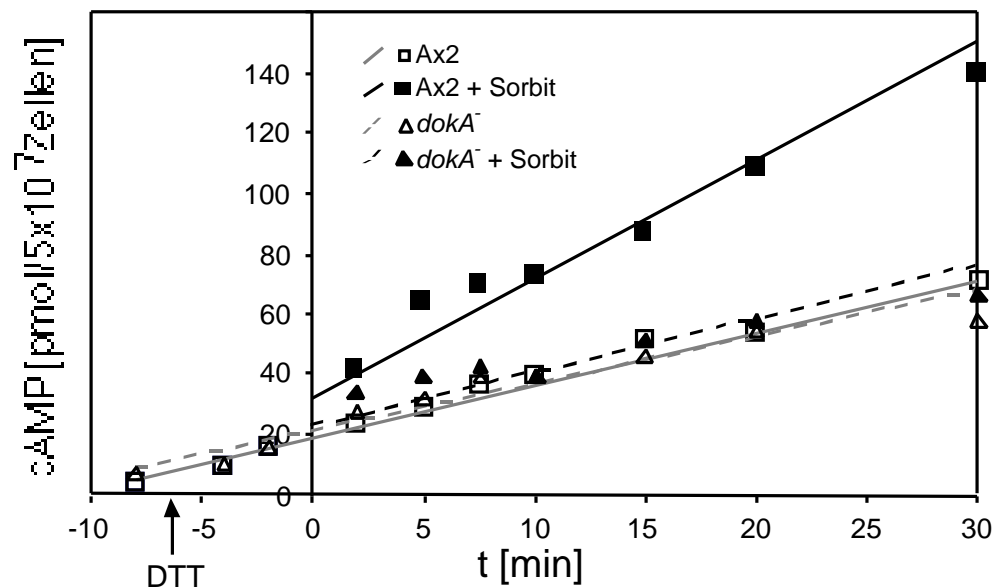
Abbildung 3-11

Gesamt-cAMP-Konzentration in Ax2-Zellen. Zur Inhibierung der extrazellulären Phosphodiesterase wurde die Zellsuspension bei  $t = -6$  min mit 5 mM DTT versetzt. Bei  $t = 0$  wurde die Osmolalität durch Sorbitzugabe auf 430 mOsm erhöht, während Kontrollzellen (offene Quadrate) mit demselben Volumen an SPB versetzt wurden. Die dargestellten Daten sind das Mittel aus den Werten von je vier unabhängigen Messreihen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messwerte. Die Geraden wurden durch lineare Regression ermittelt (bei geschockten Zellen unter Einbeziehung des aus den Daten der ungeschockten Zellen extrapolierten Wertes für  $t = 0$ ).

### 3.1.7 Die DokA-Abhängigkeit des hyperosmotisch bedingten Anstiegs der Gesamt-cAMP-Konzentration

Vergleicht man die Gesamt-cAMP-Konzentration in DTT-stimulierten, ungeschockten Ax2- und *dokA*<sup>-</sup>-Zellen, so findet man keine signifikanten Unterschiede. Dies bestätigt, dass DokA keinen Einfluss auf die (durch DTT stimulierte) Aktivität von ACA hat, welche für die deutlich höheren cAMP-Werte im Vergleich zu den intrazellulären Messungen (siehe 3.1.1-3.1.5) verantwortlich ist. In *dokA*<sup>-</sup>-Zellen bewirkt hyperosmotischer Stress jedoch keine deutliche Erhöhung der Gesamt-cAMP-Konzentration, die Werte von geschockten und ungeschockten Zellen unterscheiden sich nur geringfügig voneinander (Abb. 3-12). Im Vergleich mit den für Ax2-Zellen ermittelten Werten

wird so der Einfluss von DokA auf den cAMP-Metabolismus im Osmostress noch deutlicher als bei der Gegenüberstellung der intrazellulären cAMP-Werte in den beiden Stämmen.



**Abbildung 3-12**

Vergleich der Gesamt-cAMP-Konzentrationen von Ax2- und *dokA*<sup>-</sup>-Zellen. Während Ax2-Zellen mit einem deutlichen cAMP-Anstieg auf die Erhöhung der Osmolarität reagieren, ist die bei Sorbitzugabe festzustellende Erhöhung der cAMP-Konzentration bei *dokA*<sup>-</sup>-Zellen minimal. Die dargestellten Daten sind das Mittel aus den Werten von je mindestens vier unabhängigen Messreihen, die Geraden wurden durch lineare Regression ermittelt (bei geschockten Zellen unter Einbeziehung des aus den Daten der ungeschockten Zellen extrapolierten Wertes für t = 0).

### 3.1.8 Der hyperosmotisch bedingte Anstieg der Gesamt-cAMP-Konzentration ist auch RdeA-abhängig

Da die unter 3.1.3 dargelegten Ergebnisse gegen eine Regulation der Adenylatzyklasten ACA oder AcrA durch DokA bei hyperosmotischem Stress sprechen, trat die Möglichkeit einer Regulation der cAMP-Konzentration über die Degradation in den Vordergrund. Die intrazelluläre Phosphodiesterase RegA ist Effektor eines Phosphorelay-Systems und wird durch Phosphorylgruppenübertragung von dem Histidin-Phosphotransfer-Protein RdeA aktiviert.

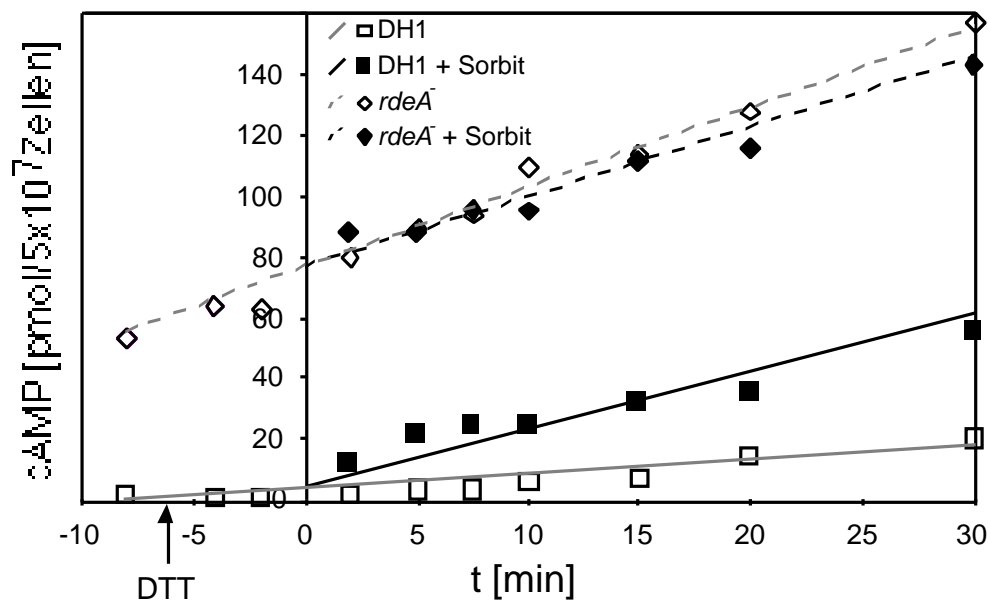


Abbildung 3-13

Vergleich der Gesamt-cAMP-Konzentrationen von DH1- und *rdeA*<sup>-</sup>-Zellen. Die cAMP-Konzentrationen in *rdeA*<sup>-</sup>-Zellen sind deutlich erhöht, zeigen jedoch keine Abhängigkeit von der Osmolarität der Zellsuspension. In DH1-Zellen ist dagegen der in Ax2-Zellen beobachtete osmotisch bedingte cAMP-Anstieg, wenngleich auf niedrigerem Niveau, deutlich zu erkennen. Die dargestellten Daten sind das Mittel aus den Werten von je drei unabhängigen Messreihen, die Geraden wurde durch lineare Regression ermittelt (bei geschockten Zellen unter Einbeziehung des aus den Daten der ungeschockten Zellen extrapolierten Wertes für t = 0).

Vergleicht man den Verlauf der Gesamt-cAMP-Konzentration von *rdeA*<sup>-</sup>-Zellen im geschockten und ungeschockten Zustand, so ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abb. 3-13). Die bereits zu Beginn der Messung erhöhten cAMP-Konzentrationen stiegen aufgrund der DTT-Zugabe weiter an, die ACA-Aktivierung blieb wie erwartet von der *rdeA*-Deletion unbeeinflusst. Es konnte jedoch kein osmotisch bedingter Anstieg der cAMP-Konzentration beobachtet werden, der DokA-abhängige Effekt war hier offenbar vollständig unterdrückt. Der Stamm WTC10, mit dem diese Experimente durchgeführt wurden, ist eine *rdeA*<sup>-</sup>-Mutante von DH1. In diesem Stamm konnte der bereits in Ax2-Zellen beobachtete osmotisch induzierte cAMP-Anstieg auf einem verringerten absoluten Niveau ebenfalls beobachtet werden. Somit war die Deletion der

Phosphotransferase RdeA die Ursache dafür, dass keine Änderung der Gesamt-cAMP-Konzentration durch den hyperosmotischen Schock in WTC10-Zellen beobachtet werden konnte.

### 3.1.9 Der Export von cAMP ist in Ax2- und *dokA*-Zellen nicht beeinträchtigt

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der osmotisch bedingte Anstieg der cAMP-Konzentration über eine Inhibierung der intrazellulären cAMP-Degradation reguliert sein könnte. Die Messungen der Gesamt-cAMP-Konzentration in Ax2-Zellsuspension (Abb. 3-11) zeigen, dass der bei den intrazellulären Messungen (Abb. 3-1) beobachtete cAMP-Anstieg nicht auf einer Inhibierung des cAMP-Exports unter hyperosmotischen Bedingungen beruht. Um sicherzustellen, dass die in 3.1.7 dargelegte Differenz zwischen Ax2- und *dokA*-Zellen tatsächlich nur auf einem veränderten cAMP-Metabolismus in der Mutante basiert und nicht auch eine unterschiedliche cAMP-Sekretionsrate in den beiden Stämmen hierzu beiträgt, wurden die intra- und extrazellulären cAMP-Konzentrationen getrennt untersucht. Hierfür wurden die Zellen wie bei der Bestimmung der Gesamtkonzentration mit DTT versetzt, die Zellen jedoch durch Zentrifugation vom extrazellulären Puffer abgetrennt und Überstand und Zellpellet getrennt analysiert. In Ax2-Zellen ist der cAMP-Anstieg bei Sorbitzugabe sowohl intra- als auch extrazellulär zu beobachten (Abb. 3-14 A). Die intrazellulären Unterschiede sind höher als bei den Messungen ohne DTT, offenbar wirken der Effekt der ACA-Aktivierung und der osmotisch bedingte Anstieg hier synergistisch. Die extrazellulären Werte differieren in den ersten Minuten noch gering, die Differenz steigt jedoch, je länger die hyperosmotischen Bedingungen andauern. Diese zeitliche Verzögerung unterstreicht, dass die Hypertonizität zunächst auf den intrazellulären cAMP-Metabolismus wirkt.



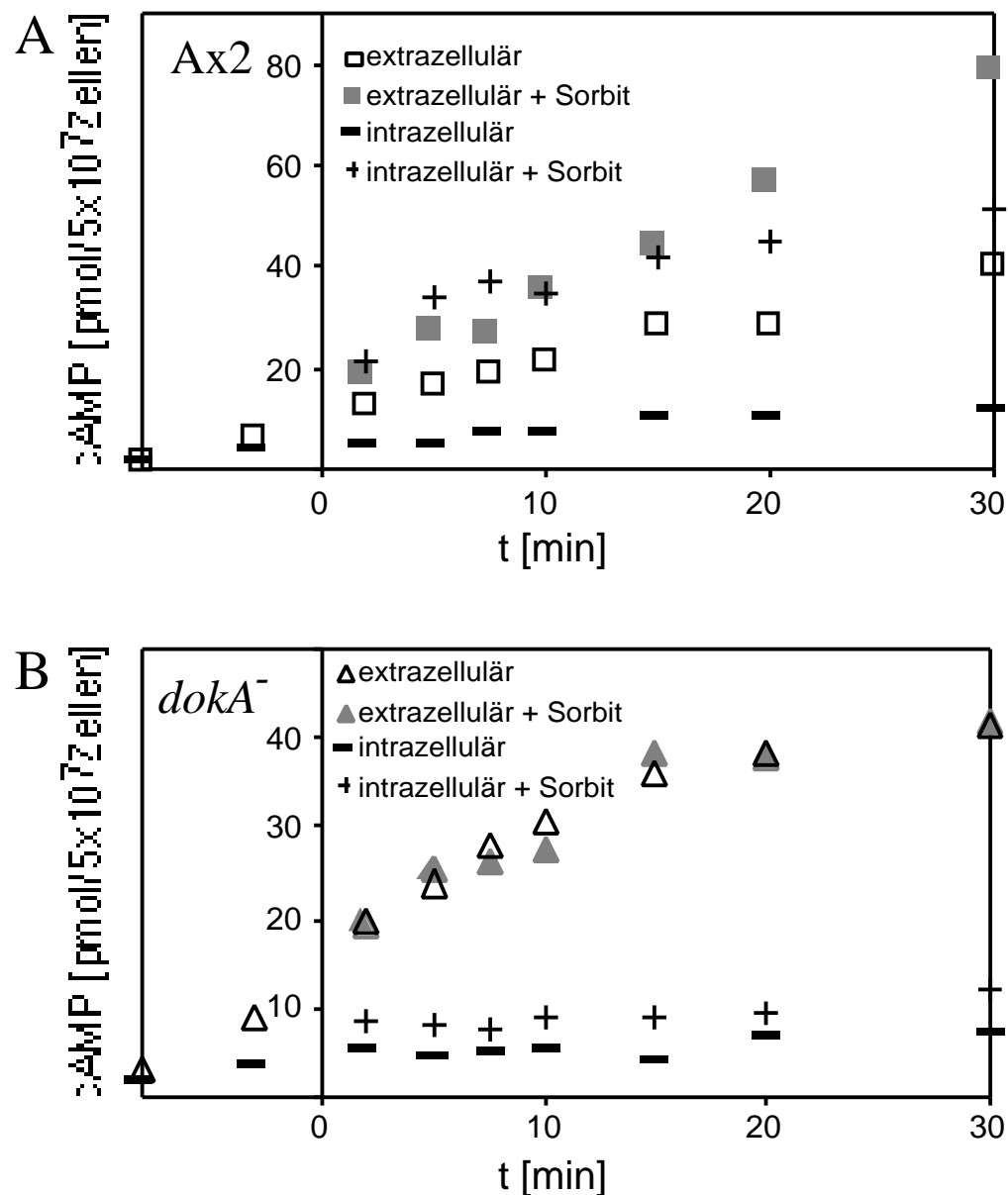


Abbildung 3-14

Aufschlüsselung der Gesamt-cAMP-Konzentrationen von *Ax2*- und *dokA<sup>-</sup>*-Zellen in ihren intra- und extrazellulären Anteil. Bei *Ax2*-Zellen bewirkt die erhöhte Osmolarität einen Anstieg der cAMP-Konzentration innerhalb wie außerhalb der Zellen, während bei *dokA<sup>-</sup>*-Zellen nur intrazellulär eine geringfügige Erhöhung des cAMP-Spiegels festzustellen ist. Die dargestellten Daten sind das Mittel aus den Werten von je drei unabhängigen Messreihen, nur die intrazellulären cAMP-Werte aus *dokA<sup>-</sup>*-Zellen beruhen auf zwei Messreihen.

Die extrazelluläre cAMP-Konzentration in *dokA*<sup>-</sup>-Zellsuspensionen blieb dagegen völlig unbeeinflusst von der Osmolarität (Abb. 3-14 B) und entsprach weitgehend den für ungeschockte Ax2-Zellen ermittelten Werten. Der geringe intrazelluläre cAMP-Anstieg von ca. 3 pmol/ 5\*10<sup>7</sup> Zellen, der ohne DTT-Stimulierung gemessen wurde (Abb. 3-3), wurde in derselben Größenordnung bei diesen Messungen beobachtet. Ein synergistischer Effekt dieses osmotisch bedingten Anstiegs mit der DTT-induzierten Steigerung war in *dokA*<sup>-</sup>-Zellen somit nicht zu erkennen. Der Unterschied war zudem nur intrazellulär zu beobachten und beeinflusste die sezernierte cAMP-Menge nicht.

### **3.2 Untersuchung der Osmoresistenz in Stämmen mit verändertem cAMP-Metabolismus**

DokA spielt eine zentrale Rolle für das Überleben von *D. discoideum* unter hyperosmotischen Bedingungen. *dokA*<sup>-</sup>-Zellen sind osmosensitiv, d.h. ihre Überlebensrate bei einer Osmolalität von 430 mOsm, sinkt binnen 2 h kontinuierlich auf unter 10 %, während Wildtypzellen diese Bedingungen nahezu vollzählig überleben (Schuster *et al.*, 1996). *dokA*<sup>-</sup>-Zellen wiesen eine erheblich reduzierte intrazelluläre cAMP-Konzentration auf und auch die Zunahme der cAMP-Konzentration unter hyperosmotischem Stress wich deutlich von der in Wildtypzellen beobachteten Konzentrationsänderung ab. Diese Beobachtung veranlasste uns, nach einem möglichen Zusammenhang zwischen dem intrazellulären cAMP-Spiegel und dem Überleben bei Osmostress zu suchen.

#### **3.2.1 Überleben von Stämmen mit verringertem cAMP-Spiegel unter hyperosmotischem Stress**

In *D. discoideum*-Zellen, die 1 h in SPB inkubierten, erhalten die beiden Adenylatzyklasen ACA und AcrA gemeinsam den cAMP-Spiegel aufrecht (siehe 3.1.3). Aufgrund der geringeren cAMP-Konzentration, die die Deletion dieser Gene zur Folge hat, wurde auch die Überlebensrate unter hyperosmotischem Stress in den beiden Deletionsmutanten CAP I und DG1100 ermittelt. Hierzu wurden die Zellen 2 h in 400 mM Sorbit in SPB geschüttelt, anschließend verdünnt und eine definierte Zellzahl mit *Klebsiella aerogenes* auf SM-Agar ausgebracht. Zur Bestimmung der Überlebensrate wurde nach 3 Tagen die Zahl der *D. discoideum*-Kolonien im Bakterienrasen ermittelt und als Prozentsatz der Kolonien der jeweiligen ungeschockten Referenzproben angegeben. Die Überlebensrate von *acaA*<sup>-</sup>-Zellen betrug 43 %, ihre Osmoresistenz war somit partiell eingeschränkt (Tab. 3-1).

Stamm	Überlebensrate
Ax2	91 (+/- 10) %
M2-1 (Ax2: <i>dokA</i> )	9 (+/- 6) %
CAP I (DH1: <i>acaA</i> )	43 (+/- 4) %
DG1100 (Ax4: <i>acrA</i> )	63 (+/- 12) %
TAM (Ax4: <i>acaA acrA</i> )	1,6 %

**Tabelle 3-1**

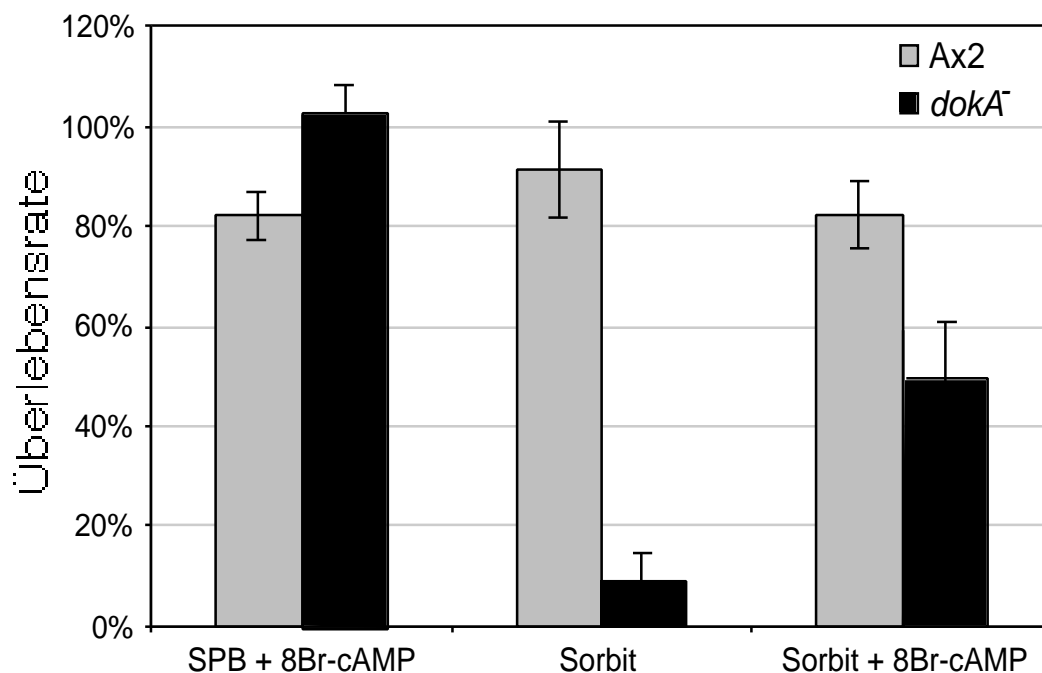
Überlebensrate von *D. discoideum*-Zellen mit reduziertem cAMP-Spiegel (nach 2 h in 400 mM Sorbit in SPB). Bei Zahlenangaben, die auf mindestens drei unabhängigen Bestimmungen beruhen, ist in Klammern die Standardabweichung angegeben.

Überraschenderweise zeigten *acrA*<sup>-</sup>-Zellen eine etwas höhere Osmoresistenz als *acaA*<sup>-</sup>-Zellen, obwohl AcrA in diesem Entwicklungsstadium deutlich aktiver war (siehe 3.1.3). Offenbar besteht kein linearer Zusammenhang zwischen der absoluten cAMP-Konzentration und der Überlebensrate bei Osmostress. Die hohe Sterblichkeit von Zellen der Doppelmutante TAM (Tab. 3-1), in denen kein cAMP nachweisbar war, deutet jedoch darauf hin, dass eine cAMP-Antwort im Osmostress von entscheidender Bedeutung für das Überleben ist. Die beiden Einzelmутanten zeigten einen qualitativ ähnlichen Verlauf der cAMP-Änderung wie er in Ax2-Zellen beobachtet wurde (Abb. 3-4, 3-5). Diese Änderung unterschied sich in der Kinetik grundlegend von der cAMP-Konzentrationsänderung in *dokA*<sup>-</sup>-Zellen, gleichzeitig waren diese beiden Zelllinien wesentlich resistenter gegen hyperosmotische Bedingungen als *dokA*<sup>-</sup>-Zellen. Dieser Zusammenhang zwischen der Kinetik der cAMP-Änderung und der Osmoresistenz wird auch im nächsten Kapitel deutlich.

### 3.2.2 Die Osmosensitivität von *dokA*<sup>-</sup>-Zellen ist durch 8-Br-cAMP supprimierbar

*dokA*<sup>-</sup>-Zellen sind osmosensitiv (Schuster *et al.*, 1996, Tab. 3-1) und ihr cAMP-Stoffwechsel ist beeinträchtigt. Um zu ermitteln, ob die Abweichung im cAMP-Metabolismus eine Ursache für die Sensitivität gegenüber hyperosmotischen Bedingungen ist, wurde der cAMP-Spiegel von *dokA*<sup>-</sup>-Zellen artifiziell erhöht. Dazu wurde das membrangängige cAMP-Analog 8-Bromo-cAMP gleichzeitig mit der Erhöhung der Osmolarität bzw. 10 min davor in Konzentrationen zwischen 5 und 20 mM zur Zellsuspension gegeben. Eine permanente Anwesenheit von 8-Br-cAMP während des zweistündigen hyperosmotischen Stresses bewirkte jedoch in keinem Fall eine merkliche Zunahme der Überlebensrate. Sie schwankte je nach Konzentration und Inkubationsdauer vor dem Osmoschock zwischen 2 und 14 %.

In Ax2-Zellen wurde die maximale cAMP-Konzentration nur während der ersten Minuten des hyperosmotischen Stresses beobachtet. In dieser Phase wurden auch die deutlichsten Unterschiede in der cAMP-Konzentration zwischen *dokA*<sup>-</sup>- und Wildtyp-Zellen gemessen (Abb. 3-3). Um den in Ax2-Zellen beobachteten cAMP-Puls in der Mutante zu simulieren, wurden 5 mM 8-Br-cAMP gleichzeitig mit der Sorbitlösung zugegeben, die Zellen nach 10 min zentrifugiert und anschließend in 400 mM Sorbit in SPB ohne cAMP-Derivat resuspendiert. In dieser Lösung schüttelten die Zellen die restlichen 110 min, bevor sie wie in den herkömmlichen Überlebenstests verdünnt und auf SM-Agar ausgebracht wurden. Diese Versuchsbedingungen bewirkten eine deutliche Zunahme der Überlebensrate von unter 10 % ohne 8-Br-cAMP auf über 50 % (Abb. 3-15). In Kontrollexperimenten mit Ax2-Zellen zeigten sich diese weitgehend unbeeinflusst von der 8-Br-cAMP-Zugabe. Somit korreliert der in Wildtypzellen beobachtete Verlauf der cAMP-Konzentrationsänderung mit der Osmotoleranz, dieses cAMP-Signal hat also eine physiologische Bedeutung für das Überleben der Zellen.



**Abbildung 3-15**

Die Überlebensrate von *dokA*<sup>-</sup>-Zellen unter hyperosmotischen Bedingungen steigt auf 52 % bei einer transienten Zugabe von 8-Br-cAMP. Die Zahl der Kolonien von *D. discoideum*-Zellen, die in SPB ohne 8-Br-cAMP inkubierten entspricht jeweils 100 %. Die Werte entsprechen dem Mittel aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 3.2.3 Extrazelluläres cAMP erhöht die Überlebensrate von *dokA*<sup>-</sup>-Zellen nur geringfügig

cAMP wirkt in *D. discoideum* auch extrazellulär als Hormon bzw. Morphogen durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. *D. discoideum* besitzt vier cAMP-Rezeptoren (cARs), die in unterschiedlichen Entwicklungsphasen exprimiert werden. Vor allem der hochaffine Rezeptor cAR1 wird schon in der Frühphase der Entwicklung, und somit auch zum Zeitpunkt der Untersuchungen, exprimiert (Rogers *et al.*, 1997). Obwohl die Affinität der Rezeptoren für 8-Br-cAMP deutlich geringer ist (van Haastert und Kien, 1983), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Wirkung von 8-Br-cAMP extrazellulär über eine Bindung an die cARs erzielt wurde. Um zu unterscheiden, ob die unter 3.2.2 beschriebene Suppression der Osmosensitivität von *dokA*<sup>-</sup>-

Zellen durch die Aktivierung der cARs oder durch eine intrazelluläre Wirkung aufgrund der Membrangängigkeit von 8-Br-cAMP erfolgte, wurden die Versuche mit einer 10-minütigen Zugabe von cAMP zur Zellsuspension wiederholt. Die Tests wurden mit 5 mM cAMP und mit 1 mM cAMP durchgeführt, Konzentrationen die ausreichen, die hochaffinen cAMP-Rezeptoren cAR1 und cAR3 ( $K_{d1} = 25$  bzw. 47 nM) (Johnson *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1992) vollständig zu aktivieren. In der Tat stieg die Überlebensrate bei Zugabe von cAMP ebenfalls, der Effekt war jedoch deutlich geringer als bei Zugabe des membrangängigen Analogs (Tab. 3-2).

zugegebenes Nukleotid, Dauer	Überlebensrate
-	9 (+/- 6) %
5 mM 8-Br-cAMP, 2 h	14 %
5 mM 8-Br-cAMP, 10 min	52 (+/- 9) %
5 mM cAMP, 10 min	13 (+/- 12) %
1 mM cAMP, 10 min	23 (+/- 11) %

**Tabelle 3-2**

Veränderung der Überlebensrate von *dokA*<sup>-</sup>-Zellen durch Zugabe von cAMP bzw. 8-Br-cAMP.

Die Bindung von cAMP an cAR aktiviert die Adenylatcyclase A über G-Proteine und induziert somit auch einen erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel. Dieser Effekt bewirkte vermutlich die geringfügig erhöhte Überlebensrate durch die Zugabe extrazellulären cAMPs. Dass die Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration entscheidend ist, wird durch Untersuchungen an anderen Mutanten gestützt. Sowohl der Stamm LW6 (Wu *et al.*, 1995), in dem das für die G -Untereinheit codierende Gen deletiert und bei dem somit die gesamte G-Protein-abhängige Signalübertragung inhibiert ist, als auch die Doppelmutante RI-9 (Insall *et al.*, 1994), bei der die beiden cAMP-Rezeptoren cAR1 und cAR3 nicht exprimiert werden können, waren weitgehend osmotolerant (Tab. 3-3). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Regulation des intrazellulären cAMP-Spiegels

und nicht die Aktivierung einer Signalkaskade durch cAMP-Rezeptoren für das Überleben unter hyperosmotischen Bedingungen essentiell ist.

Stamm	Überlebensrate
Ax2	91 (+/- 10) %
LW6 (Ax4:gβ)	73 %
RI-9 (Ax3:carA carC)	81 %

**Tabelle 3-3**

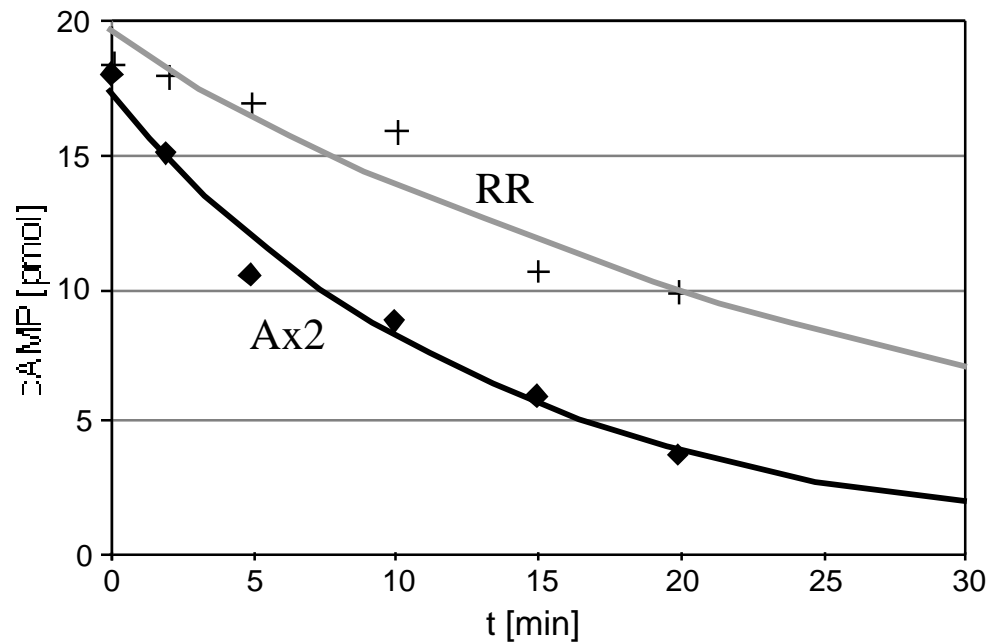
Überlebensrate von *D. discoideum*-Zellen mit inhibierter G-Protein-abhängiger Signaltransduktion.

### **1.3 Die Überexpression der Regulatordomäne von DokA verringert die Phosphodiesterase-Aktivität von RegA**

Die unter 3.1 dargestellten Resultate der cAMP-Messungen zeigen den Einfluss der Regulatordomäne von DokA auf den intrazellulären cAMP-Metabolismus, im geschockten wie im ungeschockten Zustand. Desweiteren deuten sie darauf hin, dass die Wirkung von DokA über das HPt-Protein RdeA vermittelt wird, welches die Aktivität der Phosphodiesterase RegA reguliert. Für diesen Weg der cAMP-Regulation durch DokA sprechen auch die Ergebnisse aus der Analyse der Entwicklungsphänotypen von Zellen, die die in Abb. 3-6 B dargestellten DokA-Domänen überexprimierten (Oehme, 1999, siehe auch 4.2). Um diese These genauer zu prüfen, wurde der Einfluss der Überexpression der Regulator-Domäne von DokA auf die Phosphodiesterase-Aktivität in Zellysaten untersucht. *regA* mRNA wird in vegetativen Zellen schwach exprimiert, die Expression nimmt jedoch schon früh in der Entwicklung zu (Shaulsky *et al.*, 1996). Daher wurden Ax2- und RR-Zellen zunächst für 3 h in SPB geschüttelt, anschließend lysiert, auf gleiche Gesamtprotein-Konzentration (nach Bradford) eingestellt und die lösliche Fraktion auf ihre Phosphodiesterase-Aktivität analysiert. Hierfür wurde 1,0 mM cAMP zu diesem Lysat hinzugegeben und die Abnahme der cAMP-Konzentration verfolgt. Zur Inhibierung der



extrazellulären Phosphodiesterase wurde die Lösung mit 20 mM DTT versetzt. Das Ergebnis einer typischen Messung ist in Abb. 3-16 dargestellt. Alle Messreihen zeigten eine im Vergleich mit Ax2-Lysaten verringerte cAMP-Abnahme in den Lysaten von RR-Zellen.

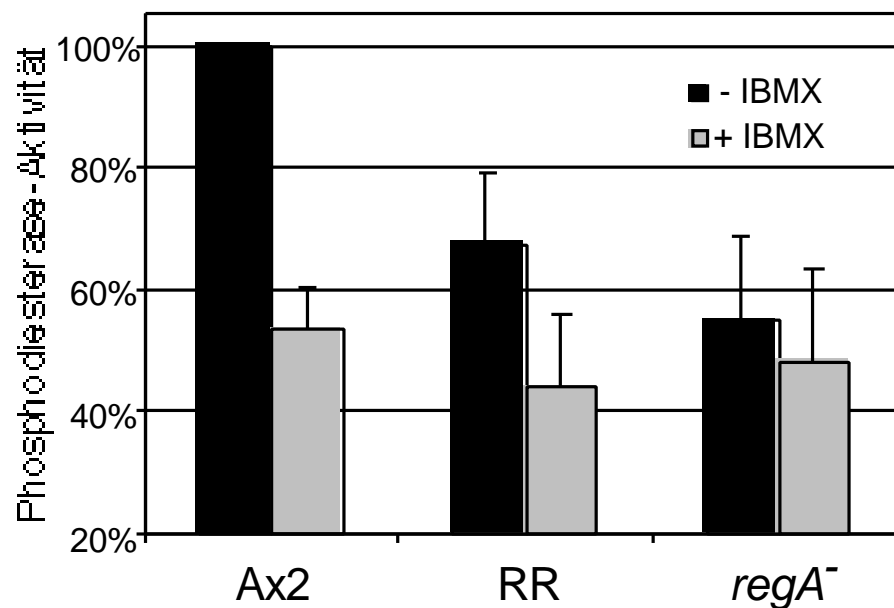


**Abbildung 3-16**

Typische Messung der Phosphodiesterase-Aktivität in Ax2- und RR-Zellysaten. Die Daten zeigen einen exponentiellen Abfall der cAMP-Konzentration, die Abnahme war in RR-Lysaten bei allen Experimenten merklich verlangsamt. Die Kurve entspricht der exponentiellen Regressionskurve.

Unter der Annahme einer Reaktion pseudo-erster Ordnung mit konstanter Enzymkonzentration ergaben sich für die relativen Aktivitäten die in Abb. 3-17 dargestellten Werte. Die Diesterase-Aktivität in RR-Lysaten beträgt etwa 70 % der in Lysaten von Ax2-Zellen ermittelten Aktivität. In Kontrollversuchen wurde IBMX zugesetzt, ein Inhibitor von RegA (Kim *et al.*, 1998), nicht jedoch der extrazellulären Phosphodiesterase. Bei Zugabe von IBMX wurde bei beiden Stämmen eine cAMP-Abbaurrate von etwa 50 % gemessen, ein Wert der auch in Lysaten von *regA*<sup>-</sup>-Zellen gefunden wurde. Diese Restaktivität ist vermutlich auf die extrazelluläre Phosphodiesterase oder einen anderen IBMX-unabhängigen Abbauweg zurückzuführen. Die gemessenen Differenzen in

der Phosphodiesterase-Aktivität zwischen den drei Stämmen können somit RegA zugeordnet werden. Die deutlich verringerte RegA-Aktivität in Zellen, die den Regulator von DokA überexprimierten, stützt die These, dass DokA-RR den RdeA/RegA-Signalweg dominant negativ reguliert.



**Abbildung 3-17**

Vergleich der Phosphodiesterase-Aktivitäten in *D. discoideum*-Zellysaten. RR-Zellen besitzen eine verringerte Aktivität gegenüber Ax2-Zellen, die allerdings höher liegt als in *regA*<sup>-</sup>-Zellen. Die Zugabe des Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX bewirkt in Ax2- und RR-Zellen einen deutlichen Rückgang der Aktivität, während sie in *regA*<sup>-</sup>-Zellen nahezu unverändert bleibt. Die Werte entsprechen dem Mittel der Geschwindigkeitskonstanten von mindestens drei unabhängigen Messreihen, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 1.4 In vitro-Interaktion von RdeA und DokA-RR

Die bisherigen Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen DokA und dem RdeA/RegA-Phosphorelay wurden aus zellbiologischen Untersuchungen zur Entwicklung (Oehme, 1999) und

zum Verhalten unter hyperosmotischem Stress, bzw. aus der Analyse von Zellysaten erhalten. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden auch biochemische Untersuchungen zur Interaktion der Regulator-Domäne von DokA mit dem Histidin-Phosphotransfer-Protein RdeA und einem dabei möglicherweise stattfindenden Phosphorylgruppentransfer durchgeführt.

#### 1.4.1 Heterologe Expression der DokA-Regulator-Domäne in *E. coli*

Die Proteine RdeA und DokA-RR wurden heterolog in *Escherichia coli* exprimiert. PCR-Produkte der DokA-Regulator-Domäne (bp 4528 – 5010, entspricht I1510 – D1670) wurden zum einen in den Vektor pQE-12 mit “6His-tag” ligiert und in *E. coli* M15[pREP4] transformiert (Oehme, 1999). Zum anderen wurden sie in den Vektor pGEX-5X-1 mit “GST-tag” ligiert und in *E. coli* BL21-DE3 transformiert. In beiden Fällen zeigte sich bei der Reinigung, dass das Protein eine hohe Neigung zur Aggregation aufwies. Es war nicht auf Konzentrationen >0,5 mg/ml anzureichern und somit für Interaktionsstudien ungeeignet.

Daher wurde das Konstrukt N- und C-terminal verkürzt, so dass nur noch der Kern der Regulator-Domäne, bestehend aus den Aminosäuren K1516 – G1638, exprimiert wurde. Dieses Konstrukt wurde in die *Bam*HI und *Xho*I Restriktionsschnittstellen der “Multiple Cloning Site” von pGEX-5X-1 ligiert, in *E. coli* BL21-*CodonPlus*(DE3)-RIL transformiert und die korrekte Basenabfolge durch Sequenzierung bestätigt. Die nach der Induktion erhaltenen Zellen wurden in Tris/NaCl-Puffer resuspendiert und lysiert. Das GST-Fusionsprotein wurde auf 0,5 ml Glutathion-Sepharose/1 Kultur vom Zellextrakt abgetrennt und mit 10 mM Glutathion eluiert. Falls die Verunreinigungen noch mehr als 25 % des Gesamtproteins umfassten, wurde das Protein über eine vorgepackte 1 ml-“Ressource Q”-Anionenaustauscher-Säule weiter aufgereinigt.

Das GST-Fusionsprotein von RdeA wurde entsprechend aus dem *E. coli*-Stamm PT17 (Thomason *et al.*, 1999) gewonnen.

### 1.4.2 Die DokA-Regulator-Domäne verringert die Phosphorylierung von RdeA

Das Histidin-Phosphotransferprotein RdeA, das keine Autokinase-Aktivität besitzt, kann durch die katalytische Domäne von *E. coli* CheA phosphoryliert werden (Thomason *et al.*, 1999). Hierzu wurde eine äquimolare Lösung beider Proteine mit [ $^{32}$ P]-ATP versetzt; die katalytische Domäne von CheA wurde dabei selbst nicht markiert. Um einen möglichen Transfer der Phosphorylgruppen von RdeA auf die Regulator-Domäne von DokA zu untersuchen, wurde zu dieser Reaktion GST-RR hinzugegeben. Bereits geringe Mengen der Regulator-Domäne von DokA verringern die Zunahme der [ $^{32}$ P]-Markierung von RdeA deutlich (Abb. 3-18). Eine Phosphorylierung von DokA-RR konnte jedoch nicht beobachtet werden. In einem Kontrollexperiment wurde die D1567A-Mutante von DokA-RR zugegeben. Dies hatte jedoch keinen Effekt auf die Phosphorylierung von RdeA, die [ $^{32}$ P]-Markierung nahm ebenso zu wie ohne DokA-Zugabe.

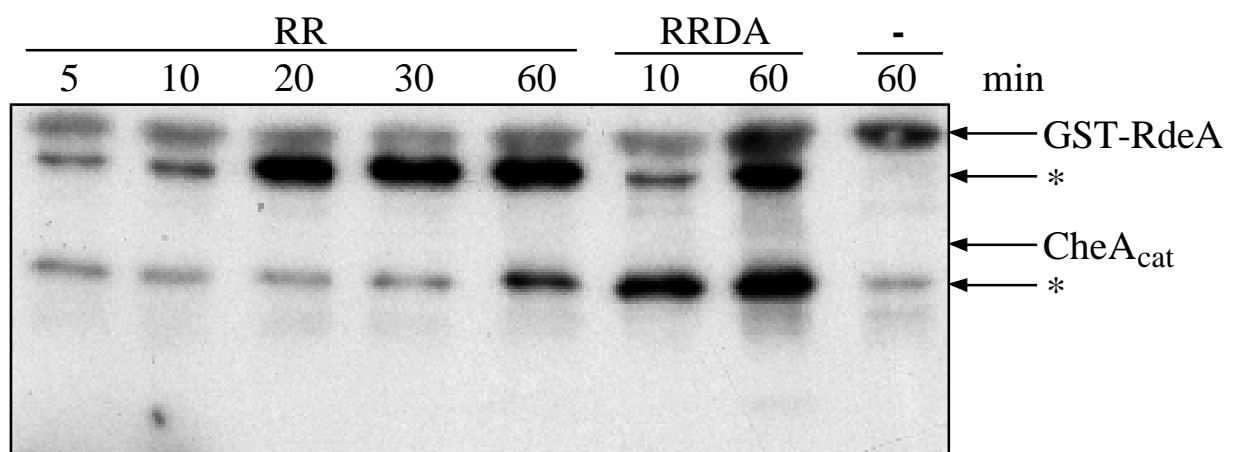
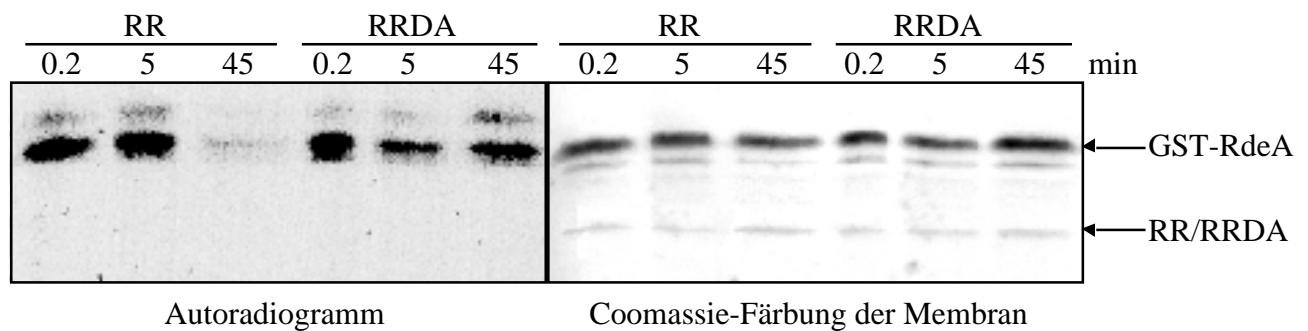


Abbildung 3-18

Phosphorylierung von RdeA in Abhängigkeit von DokA-RR. RdeA wird durch CheA<sub>cat</sub> phosphoryliert (ganz rechts). Diese Phosphorylierung wird durch Zugabe von DokA-RR (10 % Molprozent, bezogen auf die Gesamtproteinmenge) reduziert, während die Zugabe von DokA-RRDA keinen Einfluss besitzt. Die mit \* markierten Proteine sind Verunreinigungen, die bei Western-Analyse im Gegensatz zu GST-RdeA und GST-RR bzw. GST-RRDA nicht mit GST-Antikörper wechselwirkten (nicht gezeigt). Die Minutenangaben bezeichnen die Reaktionsdauer.

### 1.1.3 Die Regulator-Domäne von DokA dephosphoryliert RdeA

Um zu unterscheiden, ob die Regulator-Domäne von DokA die Phosphorylierung von RdeA unterdrückt oder entstandenes Phospho-RdeA wieder dephosphoryliert, wurde RdeA zunächst mit [ <sup>32</sup>P ]-ATP und der katalytischen Domäne von *E.coli* CheA phosphoryliert und anschließend überschüssiges [ <sup>32</sup>P ]-ATP durch Gelfiltration über eine G-50-Säule und nachfolgende Mikrodialyse entfernt. Beide Reinigungsschritte waren notwendig, um den Fortgang der RdeA-Phosphorylierung zu minimieren. Daraufhin wurde die Phospho-RdeA-haltige Proteinlösung mit der DokA-Regulator-Domäne bzw. deren D1567A-Mutante versetzt. Wie Abb. 3-19 zeigt, bewirkte der Zusatz von DokA-RR eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung von RdeA, während bei Zugabe von DokA-RR D1567A das Signal unverändert blieb. Dies zeigt, dass die DokA-Regulator-Domäne *in vitro* als Phosphatase von Phospho-RdeA wirkte. Eine Bindung von [ <sup>32</sup>P ]-Phosphat an DokA konnte auch hier zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Ob tatsächlich eine Phosphorylgruppenübertragung stattfindet und Phospho-DokA-RR unter den Versuchsbedingungen zu instabil ist oder DokA-RR als Phosphatase wirkt und die von RdeA abstrahierte Phosphorylgruppe dabei freisetzt ohne sie vorübergehend selbst zu binden, kann anhand dieser Ergebnisse nicht entschieden werden.

**Abbildung 3-19**

DokA-RR dephosphoryliert RdeA. Phospho-RdeA wird durch die Regulator-Domäne von DokA dephosphoryliert, während RR D1567A die Phosphorylierung von RdeA nicht reduziert. Die rechts abgebildete Coomassie-Färbung zeigt, dass in allen Spuren gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden.

## 1.5 Vergleich von RR-Zellen mit Zellen die andere Regulator-Domänen überexprimieren

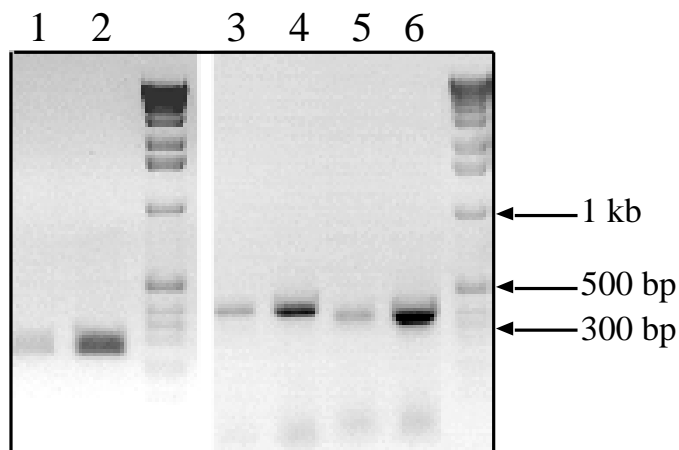
*D. discoideum*-Zellen, die die Regulator-Domäne von DokA konstitutiv überexprimieren, weisen einen “rapid development”- oder *rde*-Phänotyp auf (Oehme, 1999), wie er erstmals von R. Kessin (Kessin, 1977) beschrieben wurde. Wie andere Mutanten mit *rde*-Phänotyp zeigen DokA-RR-Überproduzenten ein merklich rascheres Fortschreiten in der frühen Entwicklung, sind jedoch in der terminalen Differenzierung unterschiedlich stark inhibiert. Der Zusammenhang zwischen diesem Entwicklungsphänotyp und den erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentrationen (siehe 3.1.4, 3.1.5) wird unter 4.2 diskutiert.

### 1.5.1 Die homologe Überexpression weiterer Regulator-Domänen

Die Überexpression von Proteinen eines Signalübertragungsweges kann unphysiologische Effekte bewirken, die nicht direkt mit der Funktion des Proteins zusammenhängen. Um die Spezifität der Wechselwirkung der überexprimierten DokA-Regulator-Domäne mit anderen Signalproteinen und

damit die Relevanz des durch die Überexpression erhaltenen Phänotyps einschätzen zu können, wurde eine Reihe weiterer Regulator-Domänen aus *D. discoideum* in Ax2-Zellen unter Verwendung des Vektors pDEX-RH (Faix *et al.*, 1992) exprimiert. Dabei handelte es sich um die Regulatoren von DhkA, DhkD, Skl607, Ssa688, Ssg478, Ssi667 und Ssk767. Exemplarisch sind hier die Stämme *DhkA-RR<sup>+</sup>* und *Ssg478-RR<sup>+</sup>* dargestellt, in denen die Regulator-Domänen von DhkA, codiert durch bp 6052-6450 aus *dhkA* (Wang *et al.*, 1996), und von Ssg478, das im Rahmen des japanischen *Dictyostelium* cDNA-Projektes gefunden wurde und dem bisher noch keine Funktion zugeordnet werden konnte, überexprimiert wurden. Die Sequenz der Regulatordomäne von Ssg478, das, wie anhand der bisher vorliegenden Sequenz zu sehen, ebenfalls ein Homolog einer Hybridhistidinkinase darstellt, wurde veröffentlicht (DDBJ/EMBL/GenBank Zugangsnummer AF258796).

Die Überexpression der Regulator-Domänen in den Stämmen RR (*DokA-RR<sup>+</sup>*), *DhkA-RR<sup>+</sup>* und *Ssg478-RR<sup>+</sup>* wurde durch RT-PCR bestätigt. Hierfür wurde die Gesamt-mRNA aus den jeweiligen Zellen bzw. aus Ax2-Zellen gewonnen, die sich in Schüttelkultur in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die für die Regulator-Domänen codierende mRNA wurde unter Verwendung der unter 5.1.4 aufgeführten Primerpaare und des Access RT-PCR-Systems durch AMV-Reverse Transkriptase in cDNA überschrieben und diese durch *Tfl* DNA Polymerase in einer PCR-Reaktion vermehrt. Dabei wurde nicht unterschieden, ob die mRNA für natives Wildtyp-Protein oder für die mittels pDEX-RH unter der Kontrolle des Aktin-15-Promotors exprimierte Protein-Domäne codierte. Bei allen drei untersuchten Regulatoren wird die mRNA in axenisch wachsenden Ax2-Zellen exprimiert. Die überexprimierenden Stämme enthalten wie erwartet deutlich höhere mRNA-Konzentrationen (Abb. 3-20).



**Abbildung 3-20**

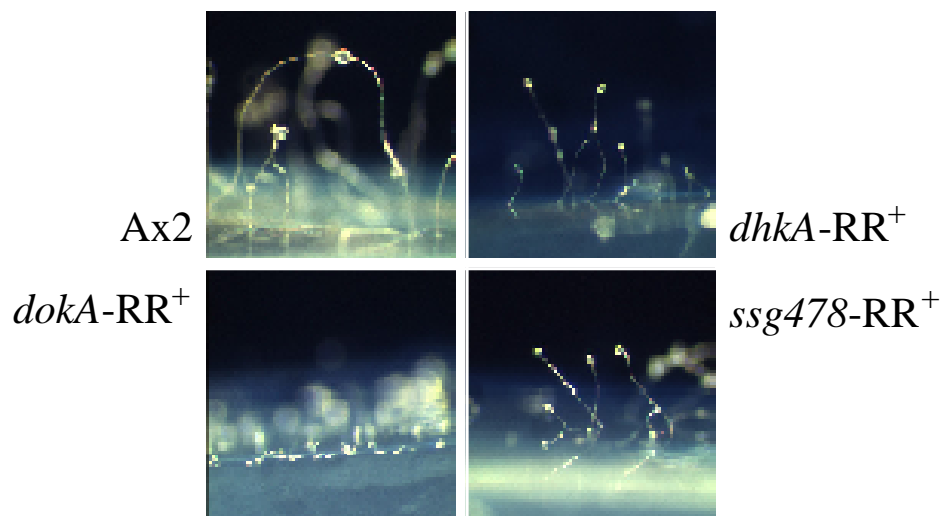
Agarose-Gel der RT-PCR-Produkte der Regulatoren DokA, Ssg478 und DhkA. Der Vergleich der Expression der jeweiligen Regulatoren in Ax2 und den drei Zelllinien RR (*dokA-RR<sup>+</sup>*), *ssg478-RR<sup>+</sup>* und *dhkA-RR<sup>+</sup>* demonstriert die Überexpression. Die RT-PCR-Produkte stammen aus folgenden Reaktionen:

- 1: RNA aus Ax2-Zellen mit *dokA-RR*-Oligonukleotiden
- 2: RNA aus RR-Zellen mit *dokA-RR*-Oligonukleotiden
- 3: RNA aus Ax2-Zellen mit *ssg478-RR*-Oligonukleotiden
- 4: RNA aus *ssg478-RR<sup>+</sup>*-Zellen mit *ssg478-RR*-Oligonukleotiden
- 5: RNA aus Ax2-Zellen mit *dhkA-RR*-Oligonukleotiden
- 6: RNA aus *dhkA-RR<sup>+</sup>*-Zellen mit *dhkA-RR*-Oligonukleotiden

### 1.5.2 Entwicklungsphänotyp der *D. discoideum*-Stämme *dhkA-RR<sup>+</sup>* und *ssg478-RR<sup>+</sup>*

Untersuchte man die Entwicklung der jeweiligen Zellen auf Phosphat-Agar, war zu erkennen, dass die Überproduktion von DokA-RR ein Verharren der Aggregate in einer Entwicklungsstufe, die als “Mound” bezeichnet wird, bewirkte (Abb. 3-21). Ax2-Zellen, wie auch die anderen beiden Stämme differenzierten dagegen terminal, es bildeten sich deutlich sichtbar Stiel und Sporenkopf der Fruchtkörper aus. Die Stämme *dhkA-RR<sup>+</sup>* und *ssg478-RR<sup>+</sup>* wiesen etwas kleinere Fruchtkörper als Ax2 auf, unterschieden sich jedoch ansonsten nicht von ihrem Ausgangsstamm.



**Abbildung 3-21**

Vergleich der Entwicklungsphänotypen von Ax2-Zellen und Zellen, die Regulator-Domänen homolog überexprimieren. Die Überexpression des Regulators von DokA bewirkt, dass die Zellen im „Mound“-Stadium verharren, während Zellen, die den Regulator von DhkA bzw. Ssg478 überexprimieren, terminal differenzieren und morphologisch intakte Fruchtkörper ausbilden. Diese sind etwas kleiner als bei Ax2-Zellen.

Dieser Unterschied wurde auch bei der Entwicklung auf cAMP-S-haltigem Agar deutlich. cAMP-S ist ein nur langsam hydrolysierbares cAMP-Analog. In einem Hintergrund von 2  $\mu\text{M}$  cAMP-S können *D. discoideum*-Zellen die nanomolaren cAMP-Pulse, die als Signal zur Aggregation ausgesandt werden, nicht detektieren (Rossier *et al.*, 1978). Beide Stämme, *dhkA-RR<sup>+</sup>* und *ssg478-RR<sup>+</sup>*, aggregierten auf cAMP-S-Agar ebensowenig wie Ax2-Zellen. Die Entwicklung von DokA-*RR<sup>+</sup>*-Zellen wurde dagegen nicht durch cAMP-S beeinträchtigt, die Zellen aggregierten genauso wie in Abwesenheit dieses cAMP-Analogs. Die Überexpression des DokA-Regulators bewirkte somit eine „cAMP-S-Resistenz“ von *D. discoideum*-Zellen, während die anderen untersuchten Regulatoren keinen vergleichbaren Einfluss auf die Entwicklung aufwiesen.

Auch die Expression der Regulatoren von DhkD, Skl607, Ssa688, Ssi667 und Ssk767 bewirkte die Ausbildung intakter Fruchtkörper und Inhibierung der Aggregation der Zellen im cAMP-S-Hintergrund.

## **1.6 Membran und Cytoskelett als Effektoren bei hyperosmotischem Stress**

Neben der Untersuchung der Signaltransduktionskomponenten auf die DokA direkt wirkt, wurden auch generelle Untersuchungen zu zellulären Veränderungen, die der hyperosmotische Schock bewirkt, durchgeführt. *Dictyostelidae* besitzen im Gegensatz zu Bakterien- und Pflanzenzellen keine Zellwand, die einen Schutz gegen äußeren Druck darstellt. Die Struktur der Zelle wird vielmehr durch das Cytoskelett bestimmt. Fortbewegung wie auch eine Reaktion auf äußere Kräfte werden über eine Rearrangierung dieses dynamischen Endoskeletts ermöglicht. Bei hyperosmotischem Stress wurde in *D. discoideum* eine weitreichende Rearrangierung des Cytoskeletts festgestellt (Kuwayama *et al.*, 1996; Insall, 1996), wobei vor allem die Verstärkung des membranassoziierten Zellcortex zu einem schalenartigen Gebilde beobachtet werden konnte. Diese Beobachtungen veranlassten uns, die Veränderungen in den beiden Kompartimenten Cytoskelett und Membran genauer zu untersuchen.

### **1.6.1 Die Proteinmenge der Membranfraktion nimmt bei osmotischem Stress zu**

Zur Analyse der osmotisch bedingten Veränderungen wurden Ax2-Zellen, die nach 1 h in SPB für 2 h in 400 mM Sorbit/SPB inkubierten, was einer Osmolalität von 430 mOsm entspricht, mit Zellen, die 3 h in SPB (34 mOsm) inkubierten, verglichen. Um einen umfassenden Überblick zu erhalten, wurde die Membranfraktion nach der von J. Spudich entwickelten Methode (Goodloe-Holland und Luna, 1987) isoliert. Der dabei als “crude membrane fraction” erhaltene Anteil enthielt auch einen Teil der membranassoziierten cytoskelettalen Proteine. Die durch wiederholtes Schockfrieren und Auftauen lysierten Zellen wurden auf einem Saccharose-Stufengradienten fraktioniert. Die dabei an der Interphase erhaltene Membranfraktion wurde mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert (Zischka *et al.*, 1999; Zischka, 2000). Auffällig war bereits bei der

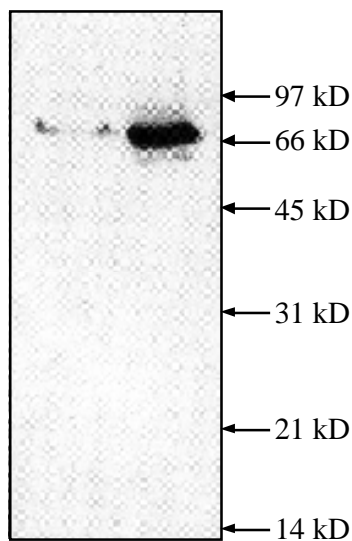
Präparation der Proben, dass die erhaltene Menge an Membranfraktion geschockter Zellen die Menge der aus ungeschockten Zellen gewonnenen Fraktion deutlich übertraf. Die sowohl nach Bradford, als auch mittels der BCA-Methode analysierten Proteinmengen der Membranfraktion geschockter Zellen waren etwa dreimal höher als die ungeschockter Zellen (Tab. 3-4).

Methode	Zahl der unabhängigen Messungen	Proteinmenge in SPB (in mg/10 <sup>8</sup> Zellen)	Proteinmenge in SPB/400 mM Sorbit (in mg/10 <sup>8</sup> Zellen)	Verhältnis der Proteinmengen
BCA	8	0,82 (+/- 0,46)	3,22 (+/- 1,53)	3,5 (+/- 1,1)
Bradford	7	0,54 (+/- 0,28)	1,55 (+/- 0,76)	3,0 (+/- 1,2)

**Tabelle 3-4**

Vergleich der Proteinmengen in Membranfraktionen von *D. discoideum*-Zellen nach 2 h bei 430 mOsm bzw. bei 34 mOsm. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse wurden die Resultate der Proteinbestimmungen nach Messmethode getrennt aufgeführt. Das rechts aufgelistete Verhältnis entspricht dem Mittel aus den Verhältnissen der Proteinmengen geschockter zu nicht-geschockter Zellen aus Einzelbestimmungen. In Klammern sind die jeweiligen Standardabweichungen aufgeführt.

Diese Zunahme war vermutlich in erster Linie auf die im hyperosmotischen Schock beobachtete Verstärkung des Zellcortex zurückzuführen (Kuwayama *et al.*, 1996). Es konnte jedoch auch eine spezifische Zunahme bestimmter Transmembranproteine beobachtet werden: Sowohl eine Untereinheit der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase als auch Calreticulin nahmen in der Membranfraktion geschockter Zellen deutlich zu (Zischka *et al.*, 1999). Im Falle von Calreticulin konnte dies sowohl durch Sequenzierung der Proteinspots aus den 2D-Gelen als auch durch Nachweis mit einem monoklonalen Antikörper gegen Calreticulin aus *D. discoideum* gezeigt werden (Abb. 3-22). Calreticulin ist ein Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Faltungshelfer im endoplasmatischen Reticulum (ER). Bei hyperosmotischem Stress findet offenbar auch eine verstärkte Assoziation subzellulärer Kompartimente wie dem ER am Cortex statt.



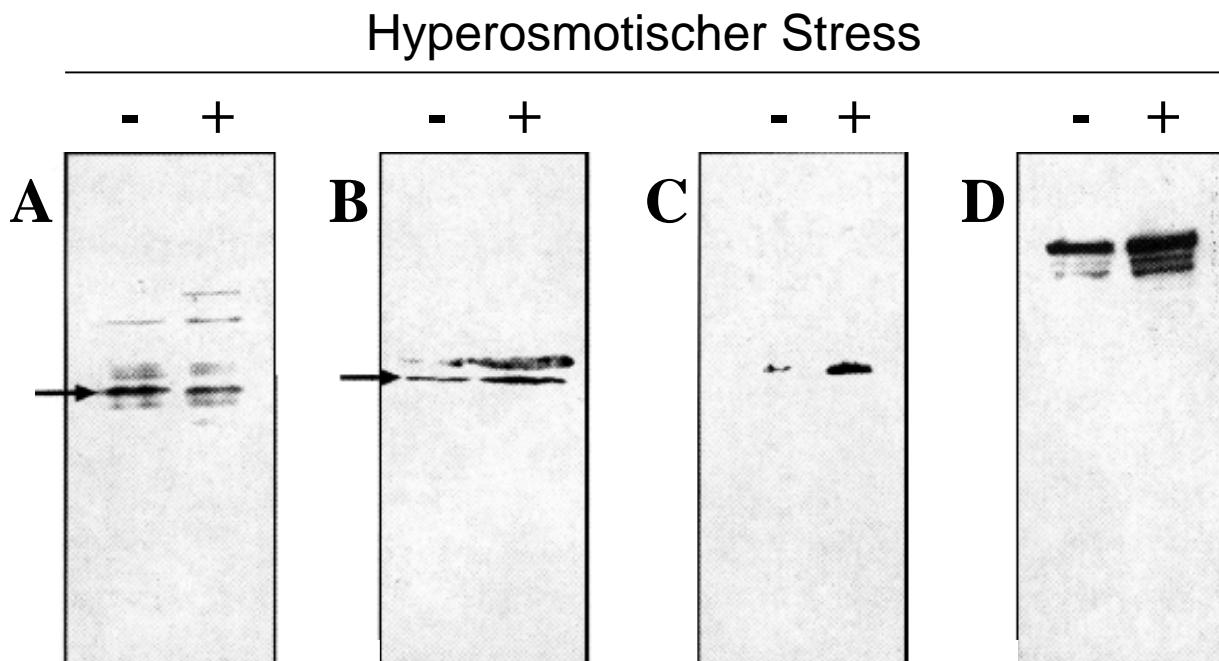
**Abbildung 3-22**

Anti-Calreticulin-Western Blot von Membranfraktionen nichtgeschockter (links) und geschockter Ax2-Zellen (rechts). Calreticulin akkumuliert bei hyperosmotischem Stress in der Membranfraktion.

### 1.6.2 Veränderungen im Cytoskelett durch hyperosmotischen Stress

Auch im Cytoskelett konnte durch den hyperosmotischen Stress eine Veränderung der Proteinzusammensetzung festgestellt werden (Zischka, 1999). Als Cytoskelett wurde dabei die in 1 % Triton X-100 unlösliche Fraktion definiert (nach Chia *et al.*, 1993). Die Gesamtproteinmenge im Cytoskelett veränderte sich nur geringfügig, es konnte ein etwa 20 %iger Anstieg an Protein festgestellt werden. Die Proteinmessungen wurden mit BCA durchgeführt, da diese Methode relativ unempfindlich gegenüber Detergenzien ist (Rehm, 1997). Die 2D-Gelelektrophorese ergab jedoch eine deutliche Veränderung der Proteinmenge bei einzelnen Proteinen, die wiederum durch Edman-Sequenzierung identifiziert und, wenn möglich, durch Western-Analyse bestätigt wurden. Eine deutliche Abnahme zeigte sich bei einem bis dato unbekannten Protein, das aufgrund der Sequenzhomologie zu ARP87C aus *Drosophila melanogaster* der Klasse der ARP-Proteine (actin-related proteins) zugeordnet wurde, und bei DdLIM (Abb. 3-23 A). DdLIM ist ein Protein, das bei der Ausbildung von Filo- und Pseudopodien beteiligt ist (Prassler *et al.*, 1998). Die beobachtete

Verringerung der Konzentration dieses Proteins im Cytoskelett korreliert mit der Beobachtung, dass sich diese Ausstülpungen bei hyperosmotischem Stress zurückbilden (Kuwayama *et al.*, 1996).



**Abbildung 3-23**

Western Blots von Cytoskelettfractionen nichtgeschockter und geschockter Ax2-Zellen. Die Menge an DdLIM nimmt bei hyperosmotischem Stress ab, die Menge an eEF1 und Myosin steigt dagegen an.

(A) Anti-DdLIM-Western.

(B) Anti-eEF1 -Western.

(C) Western gegen die regulatorische leichte Kette von Myosin.

(D) Western gegen die schwere Kette von Myosin-II.

Die Pfeile markieren DdLIM bzw. eEF1 .

Bei anderen Proteinen wurde dagegen eine deutliche Zunahme der Konzentration im Cytoskelett nach 2 h unter hyperosmotischen Bedingungen beobachtet. So fanden sich die beiden Elongationsfaktoren eEF1 (Abb. 3-23 B) und eEF1 (Zischka *et al.*, 1999) verstärkt an das Cytoskelett assoziiert, was als Maßnahme gedeutet wird, die Translation zu drosseln (Edmonds *et al.*, 1998). Ebenso wurde eine deutliche Zunahme an konventionellem Myosin im Cytoskelett

festgestellt. Dies zeigte sich sowohl bei der schweren Kette von Myosin II (MHC), als auch bei der regulatorischen leichten Kette (RMLC, Abb. 3-23 C, D). Die Zunahme dieser beiden Proteine zeigt nicht nur eine Umlagerung des Cytoskeletts zur Verstärkung des Zellcortex, es findet auch eine zusätzliche Rekrutierung von cytosolischem Myosin II ans Cytoskelett statt.

## 4 Diskussion

### 4.1 cAMP ist ein sekundärer Botenstoff im hyperosmotischen Stress und wird durch DokA reguliert

Das Hybridhistidinkinase-Homolog DokA ist essentiell für das Überleben von *Dictyostelium discoideum* unter hyperosmotischen Bedingungen (Schuster *et al.*, 1996), die Wirkungsweise von DokA war bisher jedoch noch weitgehend ungeklärt. Aufgrund der Homologie zu bakteriellen Signaltransduktionsproteinen und der Osmosensitivität der *dokA*<sup>-</sup>-Mutante wurde angenommen, dass DokA eine Rolle in der Signalübertragung bei der Osmoregulation spielt. Ein zentraler Signalweg in *D. discoideum*, der sowohl in der Chemotaxis als auch unter hypertonen Stressbedingungen die Umlagerung von Myosin-II-Filamenten reguliert, wird über den Botenstoff cGMP gesteuert (Kuwayama und van Haastert, 1998). Die cGMP-Regulation ist jedoch in *dokA*<sup>-</sup>-Zellen nicht beeinträchtigt, weshalb eine direkte Beteiligung von DokA an diesem Signalweg ausgeschlossen werden kann.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen der intrazellulären cAMP-Konzentration in Ax2-Zellen zeigen, dass auch ein Konzentrationsanstieg dieses zyklischen Nukleotids durch hyperosmotischen Stress induziert wird. Die cAMP-Konzentration pro Zelle steigt in Reaktion auf den osmotischen Schock auf den 4-5-fachen Wert und sinkt anschließend wieder geringfügig, bleibt insgesamt jedoch deutlich erhöht (Abb. 3-1). Unter Berücksichtigung der dabei auftretenden Reduktion des Zellvolumens um mehr als 50 % ergibt sich eine Steigerung der cAMP-Konzentration um den Faktor 10.

Der deutlich geringere basale cAMP-Spiegel in *dokA*<sup>-</sup>-Zellen zeigt, dass DokA einen grundlegenden Einfluss auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration in vegetativ wachsenden

*D. discoideum*-Zellen besitzt. Unter optimalen Bedingungen stellt dies jedoch keine Beeinträchtigung dar, wie sich auch bei der Deletion von Adenylatzyklase-Genen zeigte (Pitt *et al.*, 1992; van Es *et al.*, 1996; Soderbom *et al.*, 1999). Die Bedeutung von cAMP und der cAMP-regulierten PKA in vegetativen Amöben wird jedoch deutlich, wenn sich die Umweltbedingungen verschlechtern, etwa bei Nahrungsmangel (Primpke *et al.*, 2000) oder bei hyperosmotischem Stress. Gerade bei erhöhter Tonizität ist die cAMP-regulierende Wirkung von DokA von zentraler Bedeutung. Zwar steigt auch in *dokA*<sup>-</sup>-Zellen die intrazelluläre cAMP-Konzentration bei Erhöhung der Osmolarität, Ausmaß und Kinetik weichen jedoch signifikant von der in Wildtypzellen beobachteten cAMP-Konzentrationsänderung ab (Abb. 3-3). Die unterschiedliche Kinetik in den beiden Stämmen deutet darauf hin, dass auch die Erhöhung des cAMP-Spiegels im Osmostress über DokA reguliert wird. Da jedoch auch in *dokA*<sup>-</sup>-Zellen eine cAMP-Zunahme bei Erhöhung der Tonizität beobachtet wurde, müssen daran weitere Mechanismen beteiligt sein.

Die deutlichsten Unterschiede in der cAMP-Konzentration zwischen den beiden Stämmen wurden in den ersten 10 min unter hyperosmotischen Bedingungen gemessen. Der erhöhte cAMP-Spiegel in diesem Zeitraum ist von essentieller Bedeutung, wie der Anstieg der Überlebensrate von *dokA*<sup>-</sup>-Zellen bei Zugabe eines membrangängigen cAMP-Analogs in diesem Zeitfenster zeigt (Abb. 3-15). Die Suppression der Osmosensitivität durch den transienten 8-Bromo-cAMP-Puls verdeutlicht, dass die Regulation der intrazellulären cAMP-Konzentration die entscheidende Wirkung von DokA im Osmostress darstellt. Interessanterweise wird durch eine permanente Anwesenheit derselben Konzentration an 8-Bromo-cAMP das Überleben von *dokA*<sup>-</sup>-Zellen nicht begünstigt. Somit ist nicht allein ein Anstieg an cAMP für das Überleben unter hyperosmotischen Bedingungen von Bedeutung, auch der in Ax2-Zellen beobachtete leichte Rückgang der intrazellulären cAMP-Konzentration ist offenbar für eine adäquate Reaktion der Zelle wichtig. Es ist anzunehmen, dass dieser Effekt bei der transienten Zugabe des cAMP-Analogs durch Diffusion dieser Verbindung aus der Zelle in den 8-Bromo-cAMP-freien Puffer erzielt wird.



Diese Ergebnisse belegen die Bedeutung von DokA und cAMP im Osmostress, können jedoch nicht klären, ob DokA aktiv an der Zunahme von cAMP unter diesen Bedingungen beteiligt ist, oder ob der generell geringere cAMP-Spiegel in *dokA*<sup>-</sup>-Zellen das Erreichen einer kritischen cAMP-Konzentration verhindert und dadurch indirekt die Osmosensitivität bewirkt. Die Messungen der Gesamt-cAMP-Konzentration unter Einbeziehung des sezernierten Anteils belegen jedoch, dass der durch Hypertonizität ausgelöste Anstieg der cAMP-Menge weitgehend auf die Präsenz von DokA zurückzuführen ist (Abb. 3-12). Diese Messungen geben ein klareres Bild des DokA-Effekts wieder, da die intrazelluläre cAMP-Konzentration in *D. discoideum* stets einer Pufferung durch den Export von cAMP unterliegt. Eine Beeinträchtigung dieses Exports konnte in keiner dieser beiden Zelllinien festgestellt werden (Abb. 3-14). Der cAMP-Spiegel wird bei hyperosmotischem Stress somit nicht über die Sekretion, sondern über den cAMP-Metabolismus reguliert, und DokA ist ein entscheidender Faktor in dieser Regulation.

Um den regulatorischen Einfluss von DokA genauer zu analysieren, wurde auch der intrazelluläre cAMP-Spiegel von Zellen, die Domänen von DokA im Wildtyp-Hintergrund überexprimieren, untersucht. Dabei zeigt sich, dass die Überexpression der C-terminalen Regulator-Domäne eine deutlich erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration zur Folge hat (Abb. 3-10). Diese Überexpression hat auch einen erheblichen Einfluss auf die Entwicklung (Oehme, 1999): RR-Zellen zeigen eine raschere Entwicklung bis zum "Mound"-Stadium, wobei im Gegensatz zu Wildtypzellen keine Aggregationsströme beobachtet werden können. Die weitere Entwicklung ist offenbar blockiert, die erheblich kleineren Aggregate verharren fast ausschließlich in diesem Stadium, einige wenige bilden Fruchtkörper, die jedoch erhebliche morphologische Defekte aufweisen.

Im Gegensatz dazu bewirkt die Überexpression der Kinase-Domäne keine signifikante Veränderung gegenüber dem Wildtyp, weder in der Entwicklung noch in der Veränderung des cAMP-Spiegels bei hyperosmotischem Stress (Abb. 3-7). In vielen Zwei-Komponenten-Systemen bewirkt die verstärkte Expression der Kinase-Domäne allein sogenannte "gain of function"-

Phänotypen (Parkinson und Kofoed, 1992; Parkinson, 1995; Singleton *et al.*, 1998): Ohne regulierende Input-Domäne ist die Autokinase konstitutiv aktiv und bewirkt somit einen steten Phosphorylgruppenfluss. Im Fall von DokA führt dagegen nicht die Überexpression der Kinase-Domäne sondern der Regulator-Domäne zu einem derartigen Phänotyp. Dies ist insbesondere beim Vergleich der basalen cAMP-Konzentrationen zu erkennen: Der “loss of function” im *dokA*-Deletionsstamm hat einen verringerten cAMP-Spiegel zur Folge, während RR-Zellen eine 4-5-fach höhere cAMP-Konzentration als Wildtypzellen aufweisen (Abb. 3-10). Dass die Kinase-Domäne von DokA auf die hier untersuchten Eigenschaften keinen signifikanten Einfluss besitzt, zeigt sich auch in PHKR-Zellen, die ein Konstrukt überexprimieren, das sowohl Kinase- als auch Regulator-Domäne umfasst. Der Entwicklungsphänotyp wie auch der erhöhte cAMP-Spiegel dieser Zellen weisen deutliche Parallelen zu RR-Zellen auf, diese Effekte sind somit offenbar allein auf eine erhöhte Präsenz der DokA-Regulator-Domäne zurückzuführen.

Essentiell für den Effekt der Regulator-Domäne ist dabei die Seitenkette D1567. Der Sequenzvergleich mit anderen Regulatoren zeigt, dass an diesem hochkonservierten Aspartylrest die Phosphorylierung im Zuge einer Zwei-Komponenten-Signaltransduktion stattfinden sollte. *D. discoideum*-Zellen, die den mutierten Regulator RR D1567A überexprimierten, verhielten sich in der Entwicklung wie Ax2-Zellen und zeigten keines der durch die Überexpression des Wildtyp-Regulators hervorgerufenen Merkmale (Oehme, 1999). Auch die Messungen der cAMP-Konzentration in SPB und unter hypertonen Bedingungen entsprachen den für Ax2-Zellen ermittelten Werten (Abb. 3-9). Dies legt den Schluss nahe, dass nur die DokA-Regulator-Domäne an einer Phosphorylgruppenübertragung nach dem Mechanismus der Zwei-Komponenten-Signaltransduktion beteiligt ist, während die Kinase-Domäne in diesem Signalweg nicht als solche agiert.

## **4.2 Die DokA-abhängige Regulation der cAMP-Konzentration erfolgt über den RdeA/RegA-Phosphorelay**

In *D. discoideum* sind drei Adenylatzyklasen bekannt, die sich grundlegend in Struktur und Expressionsmuster voneinander unterscheiden. Die Adenylatzyklase G (ACG) wird ausschließlich in reifen Sporen exprimiert (Verkerke-van Wijk und Schaap, 1997; Aubry und Firtel, 1999) und kann somit nicht zur cAMP-Produktion im vegetativen Stadium beitragen. Die Deletion des Gens der Adenylatzyklase A (ACA) bewirkt nur eine geringfügige Abweichung der Veränderung der cAMP-Konzentration im Osmostress gegenüber Ax2-Zellen (Abb. 3-4). Eine Regulation der Zykklase-Aktivität von ACA durch DokA kann somit ebenfalls ausgeschlossen werden, zumal *acaA*<sup>-</sup>-Zellen weitgehend osmoresistent sind, sowohl in 400 mM Sorbit als auch in 300 mM Glucose (Tab. 3-1, Kuwayama und van Haastert, 1998).

Expression und Aktivität der dritten Adenylatzyklase AcrA (ACB) können während der gesamten Entwicklung und auch in vegetativ wachsenden Zellen nachgewiesen werden (Soderbom *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1998). AcrA ist die Hauptquelle von cAMP in *D. discoideum*-Zellen, was sich in der deutlich verringerten basalen cAMP-Konzentration von *acrA*<sup>-</sup>-Zellen widerspiegelt (Abb. 3-10). Bei Erhöhung der Osmolarität steigt auch in *acrA*<sup>-</sup>-Zellen die cAMP-Konzentration an, diese Zunahme ist jedoch aufgrund des Fehlens des wichtigsten cAMP-Produzenten langsamer und erheblich geringer als in Ax2- oder *acaA*<sup>-</sup>-Zellen. Die qualitative Veränderung der cAMP-Konzentration von *acrA*<sup>-</sup>-Zellen ähnelt jedoch weitgehend dem in diesen beiden Zelllinien detektierten Verlauf und unterscheidet sich grundlegend von der Veränderung in *dokA*<sup>-</sup>-Zellen. Dieser Unterschied spricht gegen eine Regulation von AcrA durch DokA im Osmostress, zumal die Aktivität von AcrA, wie auch von ACA, bei erhöhter Osmolarität abnimmt, wie *in vitro*-Messungen belegen (Meima und Schaap, 1999). Eine Regulierung des cAMP-Anstiegs über die direkte Aktivierung der cAMP-Synthese durch eine der Adenylatzyklasen kann somit weitgehend ausgeschlossen werden.

In der Doppelmutante TAM (*acaA*<sup>-</sup>, *acrA*<sup>-</sup>) ist kein cAMP nachweisbar, weder vor dem Schock noch unter hypertonen Bedingungen. ACA und AcrA dienen somit gemeinsam der Aufrechterhaltung der basalen cAMP-Konzentration und die Expression zumindest einer der beiden Zykassen ist auch für den essentiellen Anstieg der cAMP-Konzentration im Osmostress erforderlich, wie die besondere Osmosensitivität der Doppelmutante zeigt (Tab. 3-1).

Der intrazelluläre cAMP-Spiegel ist das Produkt eines Fließgleichgewichts aus Synthese durch Adenylatzyklen und Abbau durch Phosphodiesterasen (Houslay und Milligan, 1997). Demnach wäre der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration im Osmostress ebenso durch Inhibierung der Phosphodiesterase RegA zu erreichen. Die Regulation von RegA erfolgt zum einen über eine Phosphorylierung an einem Serinrest in der Phosphodiesterase-Domäne durch die MAP-Kinase Erk2 (Loomis, 1998), wie sie auch für Klasse-IV-Phosphodiesterasen von Säugern gezeigt wurde (MacKenzie *et al.*, 2000); über die Wirkungsweise dieses Regulationsweges in *D. discoideum* ist jedoch noch wenig bekannt. Deutlich besser untersucht ist die Regulation durch das HPT-Protein RdeA: Im RdeA/RegA-Phosphorelay wird die N-terminale Regulator-Domäne von RegA durch RdeA phosphoryliert, wodurch die cAMP-spezifische Phosphodiesterase-Aktivität von RegA stimuliert wird (Thomason *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1998; Shaulsky *et al.*, 1998). Die Signalkomponenten, die für die Aktivierung von RdeA verantwortlich sind, sind bisher noch nicht eindeutig identifiziert. Für DokA kann eine Rolle als Hybridhistidinkinase, die das HPT-Protein phosphoryliert, analog zu Sln1 aus *S. cerevisiae* (vgl. Abb. 2-3) ausgeschlossen werden, wie sich bereits beim Vergleich der Entwicklungsphänotypen der Deletionsmutanten zeigt. Während *dokA*<sup>-</sup>-Zellen einen glasigen Sporenkopf mit wenigen Sporen ausbilden, sind *rdeA*<sup>-</sup>-Zellen sporogen, d.h. sie bilden vorzeitig Sporen. Diese Gegenläufigkeit spiegelt sich auch im Vergleich der basalen cAMP-Konzentrationen wider: In der *dokA*<sup>-</sup>-Mutante ist kein cAMP nachweisbar, während *rdeA*<sup>-</sup>- und *regA*<sup>-</sup>-Zellen erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel aufweisen (Abb. 3-10, Thomason *et al.*, 1999).

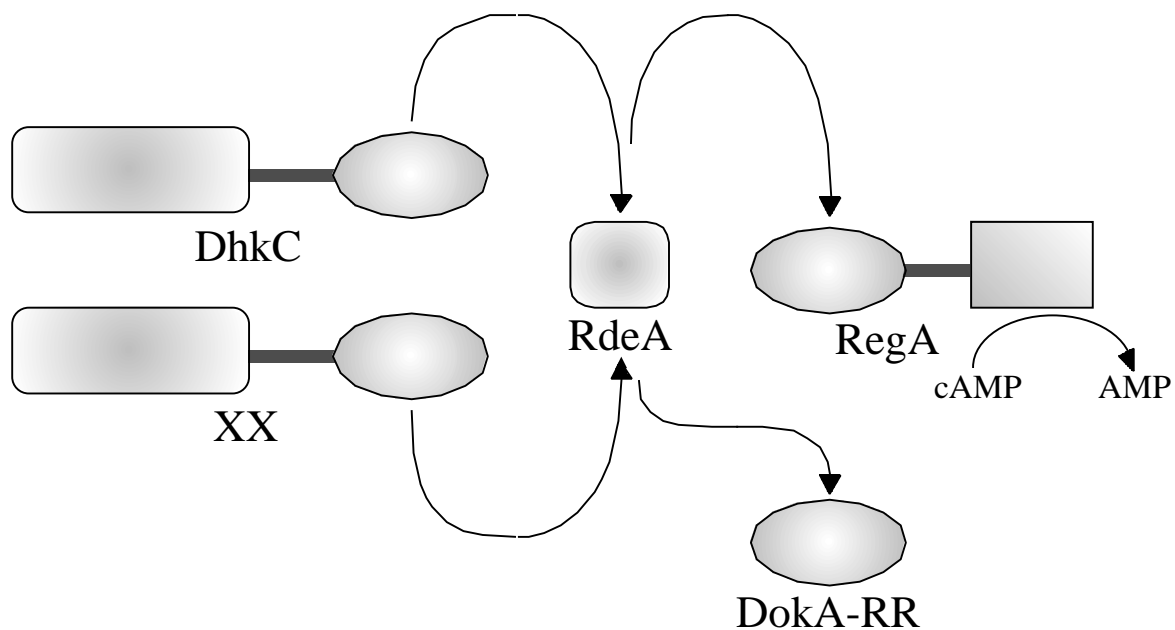
Ein putativer Phosphorylgruppendonor in der Entwicklung ist die Hybridhistidinkinase DhkC (Singleton *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass DhkC ein Ammoniak-Sensor ist, der die erhöhte Konzentration dieses Proteinabbau-Produktes detektiert, was ein wichtiges Signal für den Eintritt in die Slug-Phase der Entwicklung darstellt (Dunbar und Wheldrake, 1997). Eine Aktivierung des Phosphorelays bewirkt demnach den in dieser Phase beobachteten Rückgang der cAMP-Konzentration (Schindler und Sussman, 1979; Williams *et al.*, 1984). Auch *dhkC*<sup>-</sup>-Zellen zeigen ein beschleunigtes Wachstum, differenzieren jedoch unter Umgehung der Slug-Phase weiter und bilden morphologisch intakte Fruchtkörper (Singleton *et al.*, 1998). Somit unterscheiden sie sich deutlich von *rdeA*<sup>-</sup>- und *regA*<sup>-</sup>-Zellen, deren Entwicklung meist nicht über das "Mound"-Stadium hinausgeht, wobei Prä-Sporenzellen vorzeitig zu Sporen differenzieren, die sich im unteren Teil dieser "Mounds" ansammeln. Daher ist DhkC vermutlich nur eine von mehreren Kinasen, die Phosphorylgruppen auf RdeA übertragen und somit den cAMP-Abbau in verschiedenen Stadien der Entwicklung regulieren.

Viel deutlicher sind die Parallelen beim Vergleich der Entwicklungs-Phänotypen der Deletionsstämme von *rdeA* und *regA* mit Zellen, die den Regulator von DokA überexprimieren. So zeigen diese drei Stämme nicht nur eine beschleunigte Entwicklung bis zum "Mound"-Stadium, in dem sie dann verharren, man kann auch keine Zellströme bei der Aggregation beobachten, die Zellen sind sporogen und entwickeln sich unverändert im cAMP-S-Hintergrund (Oehme, 1999). Die Übereinstimmung des Phänotyps zwischen *rdeA*<sup>-</sup>- bzw. *regA*<sup>-</sup>-Zellen und *dokA-RR*<sup>+</sup>-Zellen einerseits und hierzu antagonistische Effekte im *dokA*<sup>-</sup>-Stamm andererseits weisen auf eine Funktion der DokA-Regulator-Domäne als negativer Regulator des RdeA/RegA-Phosphorelays hin. Die Ursache für den "rapid development"-Phänotyp (*rde*-Phänotyp) liegt sehr wahrscheinlich in einer erhöhten PKA-Aktivität in den Zellen (Abe und Yanagisawa, 1983). Diese Hypothese wird durch die erhöhten intrazellulären cAMP-Basalwerte in *RR*-Zellen und *rdeA*<sup>-</sup>-Zellen gestützt. Die hohe cAMP-Konzentration in der *rdeA*-Mutante bleibt dabei unbeeinflusst von den osmotischen Bedingungen (Abb. 3-13). Somit hängt der in Wildtypzellen (sowohl in Ax2

als auch in DH1) beobachtete hyperosmotisch bedingte cAMP-Anstieg auch von dem HPT-Protein RdeA und damit vom RdeA/RegA-Phosphorelay ab. Während die cAMP-Konzentration bei *dokA*-Deletion auf niedrigem Niveau bleibt, bewirkt die Deletion von *rdeA* unabhängig von der Osmolarität einen konstant hohen cAMP-Spiegel. Der antagonistische Effekt von DokA und RdeA in der Entwicklung spiegelt sich damit auch in diesen Ergebnissen wider.

### **4.3 Modell der Wirkungsweise von DokA auf den cAMP-Metabolismus in *D. discoideum***

Die Parallelen zwischen Deletion von RdeA bzw. RegA und Überexpression der Regulatordomäne von DokA wirft die Frage auf, wie eine Wechselwirkung zwischen diesen Proteinen den intrazellulären cAMP-Haushalt reguliert. Da sämtliche Effekte der DokA-Regulatordomäne vom Aspartylrest D1567 abhängen, ist davon auszugehen, dass ein Phosphorylgruppentransfer auf diese Seitenkette im Rahmen eines Zwei-Komponenten-Signalwegs stattfindet. Tatsächlich dephosphoryliert DokA-RR das HPT-Protein RdeA *in vitro* in Abhängigkeit von diesem Rest (Abb. 3-19). Auf die Situation in der Zelle übertragen bedeutet dies eine kompetitive Inhibierung der Phosphorylgruppenübertragung auf RegA. DokA-RR zieht Phosphorylgruppen aus dem RdeA/RegA-Phosphorelay ab und inhibiert somit indirekt die Aktivierung der Phosphodiesterase RegA (Abb. 4-1). In diesem Modell wirkt DokA-RR als Phosphatase. Aufgrund der relativ geringen Expression von DokA in vegetativ wachsenden Wildtypzellen ist eine hohe Autodephosphorylierungsrate des Regulators für eine effektive Wirkung als Phosphatase erforderlich. Dass bei den *in vitro*-Versuchen keine Phosphorylierung von DokA-RR selbst detektiert werden konnte, kann als Indiz hierfür gewertet werden. Auch die für Regulatoren charakteristische Phosphorylierung durch Acetylphosphat gelang nur in geringem Maße (F. Oehme, persönliche Mitteilung).

**Abbildung 4-1**

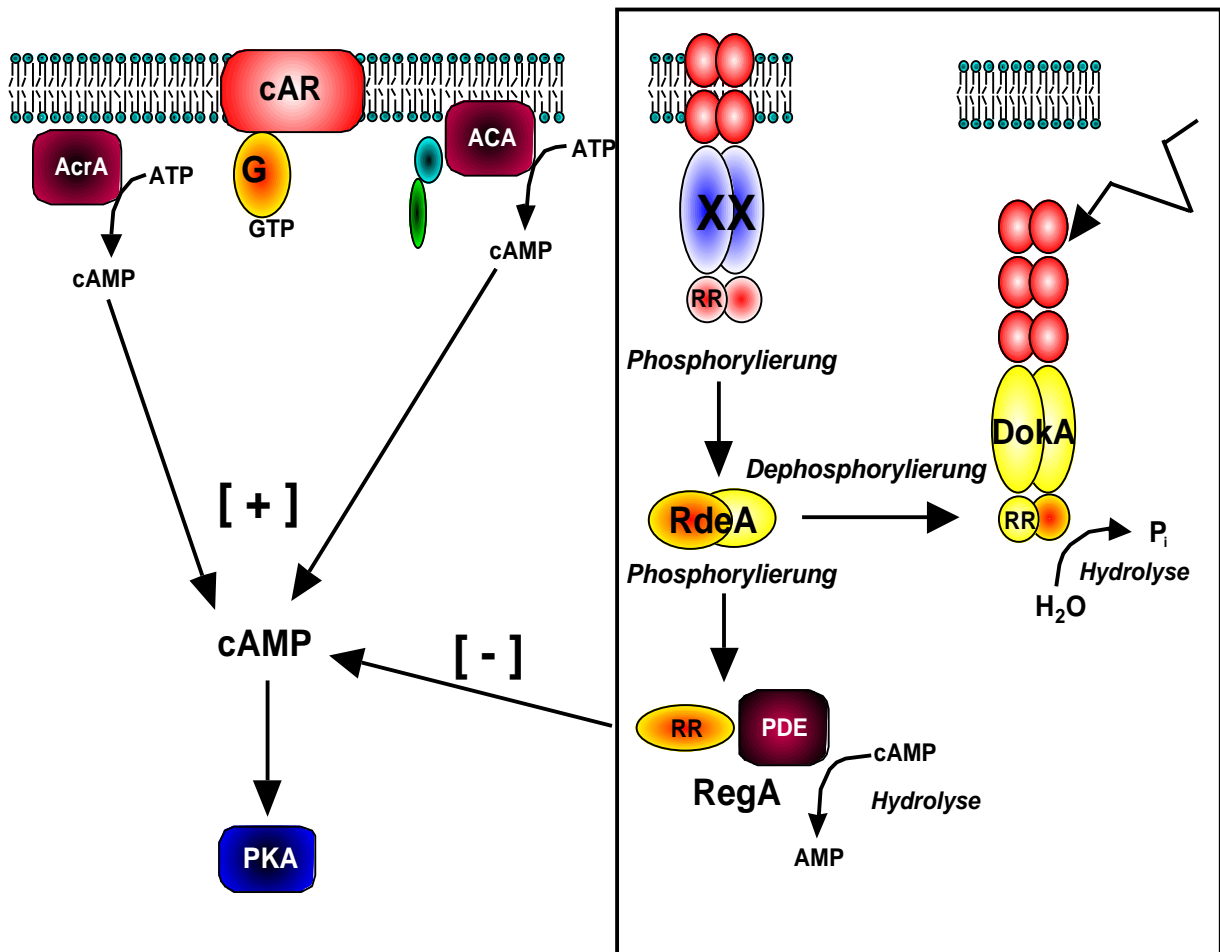
Der intermolekulare Phosphorylgruppenfluss im RdeA/RegA-Phosphorelay. Es gibt neben DhkC vermutlich mindestens eine weitere (Hybrid-)Histidinkinase, die RdeA phosphoryliert (siehe 4.2), es können also verschiedene Stimuli zur Aktivierung von RegA führen. Durch die RdeA-Phosphatase-Aktivität des Regulators von DokA wird diese Aktivierung jedoch kompetitiv inhibiert.

Im Vergleich zu einem einfachen Zwei-Komponenten-System bietet ein Phosphorelay deutlich mehr Möglichkeiten der Signalintegration und -regulation (Hoch, 1995). Die zusätzlichen phosphorylierten Zwischenstufen bieten dabei insbesondere für Phosphatasen Ansatzpunkte, den Signalfloss zu unterbrechen und somit zu kontrollieren (Appleby *et al.*, 1996; Perego, 1997). Die hier dargestellten Befunde deuten darauf hin, dass auch der DokA-Regulator als eine Phosphatase oder Phosphorylgruppen-Senke auf den RdeA/RegA-Phosphorelay wirkt. Dieses Modell erklärt die cAMP-reduzierende Wirkung der *dokA*-Deletion ebenso wie den dominant negativen Effekt der DokA-RR-Überexpression auf cAMP-Konzentration und Entwicklung (Abb. 4-2). Die Überexpression des DokA-Regulators bewirkt dabei denselben Effekt auf die Entwicklung, wie er bei der Überexpression der Regulator-domäne von RegA beobachtet wurde (Thomason *et al.*, 1998). Die Expression des RegA-Regulators ohne die C-terminale Phosphodiesterase-Domäne erzeugt eine ebensolche Phosphorylgruppen-Senke, wie sie hier für den Regulator von DokA

vorgeschlagen wird. Die Anwesenheit eines konkurrierenden Phosphorylgruppen-Akzeptors verringert den Anteil an Phosphorylgruppen, die Wildtyp-RegA (inkl. PDE-Domäne) erreichen, wodurch der intrazelluläre cAMP-Abbau inhibiert wird. Das in Wildtypzellen nach 2 min auftretende Maximum der cAMP-Konzentration entspricht dabei genau dem für eine Regulation durch Phosphodiesterasen vorhergesagten Zeitrahmen (Houslay und Milligan, 1997). RegA besitzt *in vitro* eine deutliche Tendenz zur Rückübertragung von Phosphorylgruppen auf RdeA (Thomason *et al.*, 1999). Sollte sich dies *in vivo* bestätigen, wäre eine Regulation des cAMP-Metabolismus durch eine RdeA-Phosphatase wie DokA noch effizienter und schneller.

Die Inhibierung der intrazellulären cAMP-Degradation durch Überexpression von DokA-RR zeigt sich auch im Vergleich der Phosphodiesterase-Aktivität in Zelllysaten von Ax2- und RR-Zellen (Abb. 3-16, 3-17). Die gemessene Phosphodiesterase-Aktivität in RR-Zellen ist höher als in *regA*<sup>-</sup>-Zellen, die Inhibierung von RegA ist also nicht quantitativ. Dies steht im Einklang mit dem Modell, da eine Konkurrenz der Regulatoren von DokA und RegA um Phosphorylgruppen von RdeA die Aktivierung von RegA nicht vollständig verhindert. Zudem besitzt RegA auch ohne Phosphorylierung seiner Regulator-Domäne eine basale Phosphodiesterase-Aktivität (Thomason *et al.*, 1998).





### Abbildung 4-2

Modell des intrazellulären cAMP-Metabolismus in vegetativen *D. discoideum*-Zellen. cAMP wird durch die beiden Adenylatzyklen ACA und AcrA synthetisiert und von der Phosphodiesterase RegA degradiert. Die Aktivierung von ACA erfolgt über G-Proteine, die Regulation von RegA über den RdeA-Phosphorelay und die RdeA-Phosphatase DokA. Hyperosmotischer Stress stimuliert in diesem Modell die Phosphatase-Aktivität von DokA über einen nicht geklärten Mechanismus. Über die Regulation von AcrA ist bisher nichts bekannt.

Ein kritischer Faktor in diesem Modell ist die Spezifität der Wechselwirkung zwischen DokA und RdeA. Die homologe Überexpression von sechs weiteren Regulatoren aus *D. discoideum* zeigte allerdings in keinem der Fälle die morphologischen Veränderungen in der Entwicklung oder eine Aggregation der Zellen im cAMP-S-Hintergrund, typische Merkmale des rde-Phänotyps, wie er bei Deletion von *rdeA* oder *regA* bzw. bei Überexpression der Regulator-Domänen von DokA

oder RegA auftritt (in Abb. 3-21 exemplarisch für die beiden Stämmen *dhkA-RR<sup>+</sup>* und *ssg778-RR<sup>+</sup>* gezeigt). Dies erhärtet die Annahme, dass die durch die Expression der Regulator-Domäne von DokA erzielten Effekte auf einer spezifischen, physiologischen Wechselwirkung beruhen, was von entscheidender Bedeutung für die *in vivo*-Relevanz des Modells ist.

Die Bedeutung von DokA und der Einfluss auf den intrazellulären cAMP-Spiegel in der Entwicklung tritt besonders bei der Differenzierung zu Sporenzellen zu Tage, wie die reduzierte Sporenzahl im *dokA*-Deletionsstamm und die Sporogenität von RR-Zellen zeigt. Die erhöhte Expression von DokA in der Slug- und Kulminationsphase (Schuster *et al.*, 1996) trägt vermutlich dazu bei, die mikromolaren cAMP-Konzentrationen in diesem Stadium aufrechtzuerhalten. Reife Sporen in der Dormanz weisen ebenfalls erhöhte cAMP-Konzentrationen auf, die in erster Linie durch die Aktivität der ACG erzeugt werden. Für die Stimulierung dieser Zykklase ist eine erhöhte Osmolarität im Sporenkopf erforderlich (van Es *et al.*, 1996), die insbesondere auf der hohen Konzentration an Ammoniumphosphat beruht (Cotter *et al.*, 1999). Es ist denkbar, dass das ebenfalls durch erhöhte Osmolarität aktivierte DokA auch in reifen Sporen zur Aufrechterhaltung des cAMP-Spiegels beiträgt. Da für ein früheres Entwicklungsstadium gezeigt wurde, dass Ammoniak die cAMP-Degradation durch RegA über den Phosphorelay aktiviert (Singleton *et al.*, 1998), könnte eine Inhibierung durch DokA von besonderer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Dormanz sein.

Dieses Modell ist der erste konkrete Anhaltspunkt für eine Signalintegration durch 2-Komponenten-Systeme in *D. discoideum*. Durch Stimulierung einer (Hybrid)-Histidinkinase wie DhkC wird RegA aktiviert, durch erhöhte Osmolarität wird die Aktivierung von RegA kompetitiv inhibiert. Eine Verknüpfung verschiedener Signalwege in einem Phosphorelay findet sich auch in *E. coli*, wo sowohl der Osmosensor EnvZ als auch der Aerosensor ArcB den Regulator OmpR phosphorylieren (Matsubara *et al.*, 2000). In *S. cerevisiae* reguliert der Sln1-Ypd1-Phosphorelay nicht nur über den Regulator Ssk1 die Reaktion auf hyperosmotischen Stress, auch der Regulator Skn7, der eine wichtige Rolle bei oxidativem Stress spielt, wird durch Ypd1 phosphoryliert und

aktiviert (Li *et al.*, 1998). Dies zeigt die zentrale Rolle von HPT-Proteinen wie Ypd1 oder RdeA. Die Regulation eines Phosphorelays durch eine Phosphohistidin-Phosphatase wurde kürzlich auch für *E. coli* vorgeschlagen: Der ArcB/ArcA-Phosphorelay wird durch die Aktivierung der Phosphatase SixA moduliert, die spezifisch am HPT-Modul von ArcB angreift (Matsubara und Mizuno, 2000).

Das hier entworfene Modell basiert zu einem erheblichen Teil auf Ergebnissen, die durch die Überexpression der Regulator-Domäne von DokA gewonnen wurden. Der Vergleich dieser Ergebnisse mit den Beobachtungen in Wildtyp- und *dokA*<sup>-</sup>-Zellen deutet darauf hin, dass durch die Expression dieser Domäne allein ein Regulator vorliegt, der konstitutiv RdeA dephosphoryliert. Wildtyp-DokA besitzt keinen offensichtlichen intramolekularen Effektor. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die wesentliche Aufgabe von DokA nicht die Aktivierung eines spezifischen Effekts darstellt, sondern die Wechselwirkung mit anderen Signaltransduktionsproteinen. Die N-terminal vom Regulator gelegenen Domänen von Wildtyp-DokA üben vermutlich eine regulatorische Funktion auf die Phosphatase-Aktivität des Regulators aus. So könnte durch die Hypertonizität eine Aktivierung der Regulator-Domäne erfolgen, etwa durch eine den Regulator freilegende Konformationsänderung. Erste Anzeichen hierfür stammen aus der Beobachtung, dass die Histidinkinase-Domäne von DokA bei hyperosmotischen Stress von einer Serin/Threonin-Kinase phosphoryliert wird (Oehme, 1999), Ursache und Effekt dieser Modifikation sind allerdings noch unklar. Die ungewöhnliche Primärstruktur des N-Terminus von DokA mit vielen hydrophilen, ungeladenen Aminosäuren könnte ebenfalls auf eine Tonizitätsabhängigkeit der Konformation hindeuten, deren Änderung einen Einfluss auf den C-terminalen Regulator ausüben könnte. Die eingehende Untersuchung dieses als Input-Domäne bezeichneten Bereichs von DokA lässt Aufschluss über seine Rolle erwarten (K. Busch und S.C. Schuster, persönliche Mitteilung). Ursprünglich wurden 2-Komponenten-Systeme aus Histidinkinasen und Regulatoren, in denen die Signale über die Phosphorylierung von Histidin- und Aspartylseitenketten übertragen werden, als rein prokaryotische Signaltransduktionssysteme gesehen (Parkinson und Kofoed, 1992), während

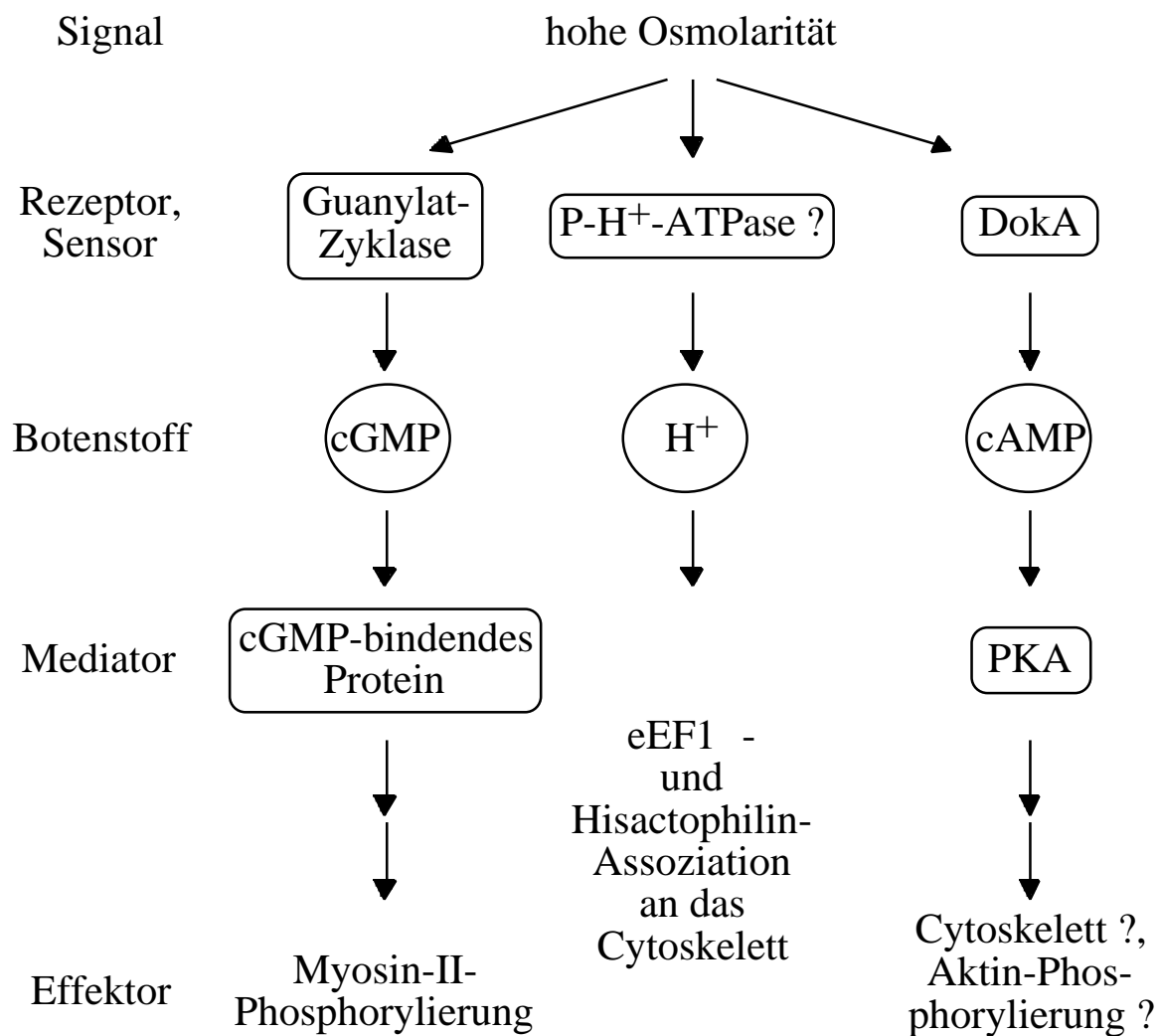
Eukaryoten Signale über die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten weiterleiten (Herskowicz, 1995). In den letzten Jahren zeigte sich jedoch, dass auch Eukaryoten 2-Komponenten-Signaltransduktionssysteme besitzen. Gerade die Detektion der Osmolarität stellt einen zentralen Bereich dar, in dem verschiedene Eukaryoten 2-Komponenten-Systeme nutzen. Nicht nur DokA in *D. discoideum* und der Sln1/Ypd1/Ssk1-Phosphorelay in *S. cerevisiae* sind hier zu nennen, auch die Hybridhistidinkinasen Nik-1 in *Neurospora crassa* (Alex *et al.*, 1996) und ATHK1 in *Arabidopsis thaliana* (Urao *et al.*, 1999) sind entscheidende Proteine in der Osmoregulation und Osmotoleranz dieser Organismen. Und auch in *Schizosaccharomyces pombe* kontrolliert das Regulator-Homolog Mcs4 die Antwort auf osmotischen und oxidativen Stress (Shieh *et al.*, 1997). Trotz der unterschiedlichen Wirkungsweisen und Effektoren dieser Signalproteine im jeweiligen Organismus (gerade DokA unterscheidet sich ja erheblich von herkömmlichen 2-Komponenten-Systemen), stellt die Osmoregulation offenbar ein Gebiet dar, in dem sich diese Form der Signaltransduktion auch in Eukaryoten bewährt.

#### **4.4 Der osmoregulatorische Signalweg in *D. discoideum***

Die hier aufgezeigte Bedeutung des intrazellulären Botenstoffs cAMP bei hyperosmotischem Stress und seine Regulation durch DokA bedeutet einen ersten Schritt in der Aufklärung dieses für das Überleben von *D. discoideum* in hyperosmotischer Umgebung essentiellen Signalwegs. Durch den indirekten Einfluss auf den cAMP-Metabolismus über den RdeA/RegA-Phosphorelay steigt die Konzentration des Botenstoffs. Das wichtigste cAMP-regulierte Protein in *D. discoideum* wie in allen Eukaryoten ist die Proteinkinase A. Aber auch eine direkte Wirkung von cAMP auf “zyklisches-Nukleotid-regulierte Kanäle” oder Homologe des Guaninnukleotid-Austauschfaktors Epac (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998) ist vorstellbar.

Der zentrale Effektor der Osmoregulation in *D. discoideum* ist das Cytoskelett. Dies zeigt sich in allen Studien, die die Auswirkungen von Hypertonizität auf diesen Organismus beschreiben (z.B.

Kuwayama *et al.*, 1996; Aizawa *et al.*, 1999; Zischka *et al.*, 1999). Auch die Zunahme an Protein in der Membranfraktion geschockter Zellen (Tab. 3-4) ist zum Teil auf die Verstärkung des cytoskelettalen Zellcortex, der eng mit der Plasmamembran assoziiert ist, zurückzuführen. Das Cytoskelett verändert sich bei hyperosmotischem Stress in seiner Zusammensetzung: einige Proteine werden verstärkt an das Cytoskelett assoziiert, andere relokalisieren ins Cytosol (Abb. 3-23, Zischka *et al.*, 1999). Der erhöhte Anteil an regulatorischer leichter Kette und an schwerer Kette von Myosin II (MHC) in der Cytoskelettfraktion ist offenbar auf die Wirkung der cGMP-vermittelten Phosphorylierung von MHC zurückzuführen. Unmittelbar nach der Erhöhung der Osmolarität steigt die MHC-Phosphorylierung, wodurch bestehende Myosin-II-Filamente depolymerisieren und sich zu neuen Strukturen insbesondere im Zellcortex umlagern können. Der Rückgang der MHC-Phosphorylierung nach 30 min (Kuwayama *et al.*, 1996) führt schließlich zur Inaktivierung und Stabilisierung der verstärkten Filamente. Die Ursache für die verstärkte Assoziierung des Elongationsfaktors eEF1 an das Cytoskelett (Abb. 3-23 B) liegt offenbar in der Azidifizierung der Zelle bei hyperosmotischem Stress. Der Anstieg der Osmolarität auf 430 mOsm bewirkt eine Abnahme des cytosolischen pH-Werts von etwa 7,5 auf 7,0 (Pintsch *et al.*, eingereicht). Eine solche Azidifizierung des Cytosols bewirkt eine verstärkte Assoziation von eEF1 an das Actomyosin-Cytoskelett (Liu *et al.*, 1996). Die Regulation anderer durch den Osmostress induzierter Umlagerungen und posttranslationaler Modifikationen ist dagegen noch weitgehend ungeklärt. Der in Wildtypzellen beobachtete bzw. der in der Mutante durch 8-Bromo-cAMP artifiziell herbeigeführte transiente Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels könnte dazu beitragen, einige dieser Effekte einzuleiten. So wird etwa die Phosphorylierung von Actin sowohl unter hyperosmotischen Bedingungen (Oehme, 1999) als auch bei Sporen in der Dormanz beobachtet (Kishi *et al.*, 1998), einem Stadium mit hoher intrazellulärer cAMP-Konzentration.

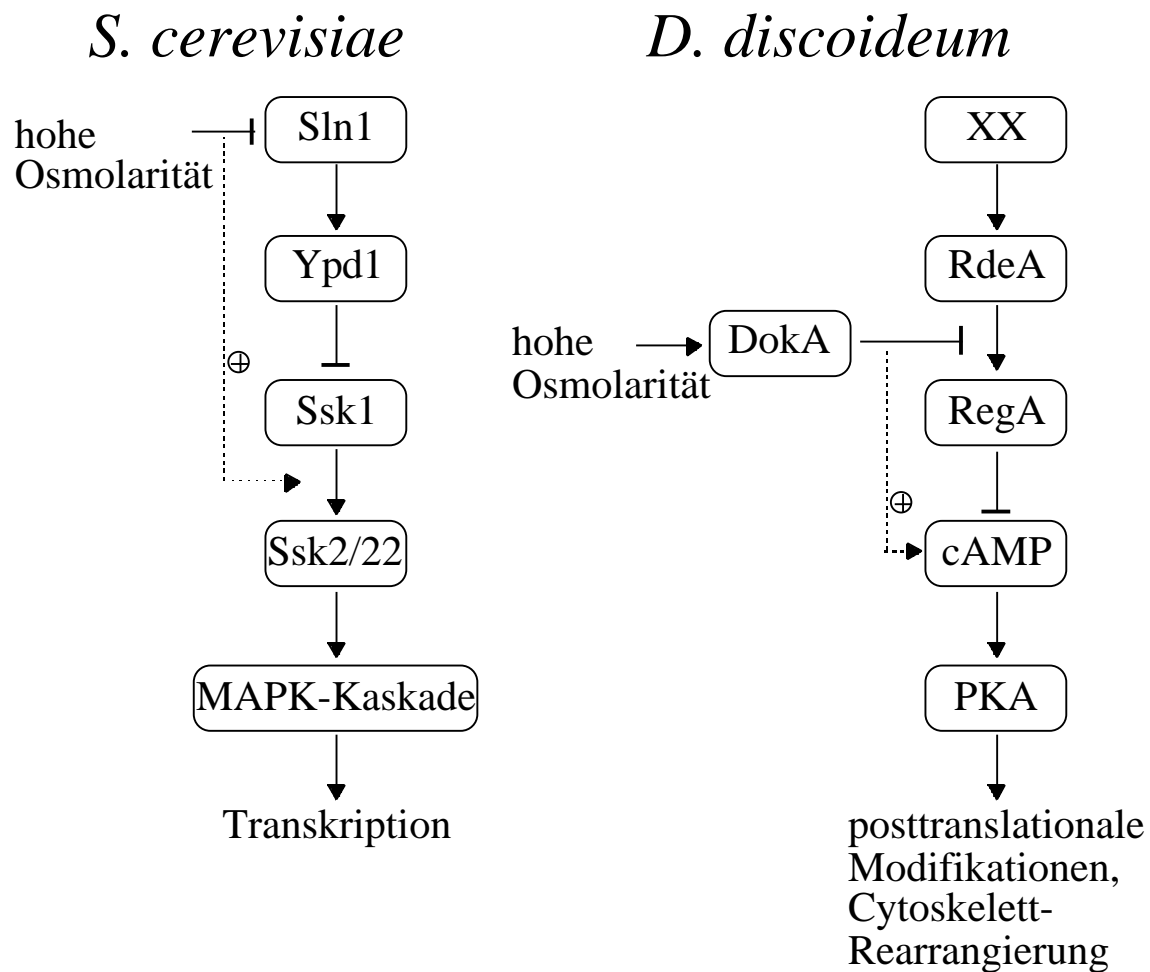
**Abbildung 4-3**

Übersicht über die in *D. discoideum* bekannten Signalwege der Osmoregulation. Fragezeichen bezeichnen mögliche Sensoren bzw. Effektoren, für die noch keine experimentelle Bestätigung vorliegt.

In der hyperosmotischen Stressantwort in *D. discoideum* konnten somit drei Signalwege mit unterschiedlichen Botenstoffen identifiziert werden (siehe Abb. 4-3). Eine direkte Wechselwirkung zwischen diesen drei Signalwegen ist unwahrscheinlich. Die maximale cGMP-Konzentration wurde erst nach 10 min in hypertoner Lösung gemessen (Kuwayama *et al.*, 1996), die Protonenkonzentration steigt je nach Messmethode 4 bzw. 10 min kontinuierlich bis ein Sättigungswert erreicht ist (Pintsch, 2000). Da das Maximum der intrazellulären cAMP-

Konzentration in Ax2-Zellen schon nach 2 min erreicht wird und die Regulation des cGMP-Spiegels in *dokA*<sup>-</sup>-Zellen nicht beeinträchtigt ist (Schuster *et al.*, 1996), kann nur die Senkung des pH-Werts cAMP-abhängig sein. T. Pintsch konnte jedoch für die mit der cytosolischen Azidifizierung gekoppelte Azidifizierung des endo-lysosomalen Systems nachweisen, dass die Botenstoffe cAMP und cGMP hierbei keinen Effekt besitzen (Pintsch, 2000).

Die Osmoregulation in *D. discoideum* beruht somit auf verschiedenen Signalwegen. Auch in *S. cerevisiae*, dem eukaryotischen Organismus, in dem die hyperosmotische Stressantwort wohl am besten untersucht ist, sind mehrere osmoregulatorische Signalwege gefunden worden (Rep *et al.*, 2000; Posas *et al.*, 2000). Von zentraler Bedeutung ist hier der Sln1-Signalweg, der über einen für Prokaryoten typischen Signaltransduktionsweg, einen Phosphorelay, eine eukaryotische MAP-Kinase-Kaskade reguliert (Maeda *et al.*, 1995; Posas *et al.*, 1996). Die zentrale Rolle eines 2-Komponenten-Systems in der Osmoregulation ist nicht die einzige Parallele mit *D. discoideum*. In Hefe verhindert der in isotonischer Umgebung aktive Phosphorelay durch Phosphorylierung des Regulators Ssk1 dessen Bindung an die redundanten MAPKKKs Ssk2 und Ssk22 (Wurgler-Murphy und Saito, 1997). Ein Anstieg der Tonizität inhibiert die Hybridhistidinkinase Sln1, das nun unphosphorylierte Ssk1 bindet die MAPKKK und aktiviert so die MAP-Kinase-Kaskade (Abb. 4-4). In *D. discoideum* inhibiert, gemäß dem in dieser Arbeit vorgeschlagenen Modell, unter isotonischen Bedingungen ein Phosphorelay die Aktivierung des eukaryotischen Signaltransduktionssystems cAMP/PKA, diese Inhibierung wird jedoch bei Hypertonizität durch eine Unterbrechung des Phosphorelays durch die Phosphatase DokA aufgehoben.

**Abbildung 4-4**

Vergleich der Osmoregulationswege durch 2-Komponenten-Systeme in *S. cerevisiae* und *D. discoideum*. In beiden Systemen verhindert der Phosphorylgruppenfluss über Hybridhistidinkinase, HPT-Protein und Regulator unter isotonischen Bedingungen die Aktivierung der MAP-Kinasen bzw. der Proteinkinase A. Bei erhöhter Osmolarität wird in Hefe die Autokinase-Aktivität der Histidinkinase, in *D. discoideum* der Phosphorylgruppentransfer auf den Regulator inhibiert, wodurch indirekt die MAPK-Kaskade bzw. PKA aktiviert und die zellspezifischen Maßnahmen eingeleitet werden. Die Sln1-homologe Histidinkinase, die den Phosphorelay in vegetativ wachsenden *D. discoideum*-Zellen aktiviert, konnte bisher nicht identifiziert werden.

Ein entscheidender Unterschied zwischen diesen beiden Organismen besteht in den Effektoren der Osmoregulation. Während in *S. cerevisiae* diverse Transkriptionsfaktoren aktiviert werden und dadurch eine erhebliche Umstellung der Transkription erfolgt (Rep *et al.*, 2000; Posas *et al.*,



2000), beobachtet man bei *D. discoideum* vor allem posttranslationale Modifikationen, strukturelle Umlagerungen und eine Inhibierung der Translation (Insall, 1996; Zischka *et al.*, 1999). Aufgrund der Tatsache, dass hierbei keine Aktivierung der Expression spezifischer Stressproteine beobachtet werden konnte, wurde Hyperosmolarität bei *D. discoideum* als eine “nicht-klassische” Stressbedingung diskutiert (Pintsch und Schuster, 2000). Hyperosmotischer Stress bewirkt jedoch auch in Fibroblasten von Mäusen eine Inhibierung der Proteinsynthese und eine verringerte Genexpression (Roig *et al.*, 2000). In PC12- und NIH 3T3-Zelllinien bewirken Hypertonizität und andere Stressbedingungen die Translokation von Proteinen aus dem Cytosol an das Actomyosin-Cytoskelett (Tsutsumi *et al.*, 2000). Die in *D. discoideum* beobachteten Schutzmechanismen unterscheiden sich somit zwar deutlich von der hyperosmotischen Stressantwort in Hefezellen, weisen aber einige Parallelen zu Zellen höherer Organismen auf. Wie diese besitzen *D. discoideum*-Zellen keine Zellwand, dem Cytoskelett kommt daher eine besondere Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Struktur unter extremen mechanischen Bedingungen zu. *Dictyostelium discoideum* könnte sich daher auch auf diesem Feld als ein nützlicher Modellorganismus erweisen.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Stämme

##### D. discoideum-Stämme

Ax2-214	axenisch wachsende Mutante von NC4 (Raper, 1935)
M2-1	<i>dokA</i> -Deletionsmutante von Ax2 (Schuster <i>et al.</i> , 1996)
RR	<i>dokA</i> (bp 4528-5010)-Überexpressionsstamm von Ax2 (Oehme, 1999)
HK	<i>dokA</i> (bp 2917-4299)-Überexpressionsstamm von Ax2 (Oehme, 1999)
PHKR	<i>dokA</i> (bp 2356-5010)-Überexpressionsstamm von Ax2 (Oehme, 1999)
RRDA	<i>dokA</i> (bp 4528-5010, A4700C)-Überexpressionsstamm von Ax2 (Oehme, 1999)
HM1015	<i>regA</i> -Deletionsmutante von Ax2 (Thomason <i>et al.</i> , 1998)
DH1	Uracil-auxotrophe Mutante
WTC10	<i>rdeA</i> -Deletionsmutante von DH1 (Chang <i>et al.</i> , 1998)
CAP I	<i>acaA</i> -Deletionsmutante von DH1 (Pitt <i>et al.</i> , 1992)
DG1100	<i>acrA</i> -Deletionsmutante von Ax4, einer weiteren axenisch wachsenden Mutante von NC4 (Soderbom <i>et al.</i> , 1999)
TAM	<i>acrA</i> -Deletionsmutante von CAP I (Soderbom und Loomis, unveröffentlicht)

- LW6  $g\beta$ -Deletionsmutante von Ax4, einer weiteren axenisch wachsenden Mutante von NC4 (Wu *et al.*, 1995)
- RI-9 *carA*- und *carC*-Deletionsmutante von Ax3, einer weiteren axenisch wachsenden Mutante von NC4 (Insall *et al.*, 1994)

#### Bakterienstämme:

- E. coli* XL1 blue Stamm K12, sup E44, hsdR17, recA1, GyrA46, thi, relA1, lac<sup>-</sup>, F'proAB<sup>+</sup>, lacIqZ\_M15, Tn10(Tet<sup>r</sup>) (Bullock *et al.*, 1987)
- E. coli* BL21(DE3) Stamm B, F<sup>-</sup>, ompT, hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>), dcm<sup>+</sup>, gal, (DE3)
- E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL Stamm B, F<sup>-</sup>, ompT, hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>), dcm<sup>+</sup>, Tet<sup>r</sup>, gal, (DE3), endA, Hte [argU, ileY, leuW, Cam<sup>r</sup>] (Weiner *et al.*, 1994) (Stratagene, Heidelberg)
- E. coli* B/2
- E. coli* PT15 *E. coli* BL21(DE3) mit pPT15 [pGEX-5X1, *rdeA* cDNA] (Thomason *et al.*, 1999)
- E. coli* AO24-28 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL mit pAO24 [pGEX-5X1, *dokA*(4546-4914)]
- E. coli* AO25-9 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL mit pAO25 [pGEX-5X1, *dokA*(4546-4914, A4700C)]
- Klebsiella aerogenes* (Williams und Newell, 1976)

#### 1.1.2 Antikörper

- anti-Kaninchen IgG (Peroxidase-gekoppelt) Sigma, Deisenhofen
- anti-Ziege IgG (Peroxidase-gekoppelt) Sigma, Deisenhofen

mAb 05:235 (anti-eEF1 )	Upstate Biotechnology, Lake Placid
mAb 252-234-3 (anti-Calreticulin)	von G. Gerisch, Martinsried
mAb 56-396-5 (anti-MHC)	von G. Gerisch, Martinsried
mAb anti-DdLIM	von G. Marriott, Martinsried
mAb anti-RMLC	von R. Chisholm, Martinsried
pAb anti-GST	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pAb anti-HKR(DokA)	(Ott, 1997)

### 1.1.3 Enzyme

<i>Bam</i> HI	New England Biolabs, Beverly
DNase I	Roche, Mannheim
DNase I (RNase-frei)	Roche, Mannheim
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)	Roche, Mannheim
<i>Pfu</i> -Polymerase	Stratagene, Heidelberg
RNase A	Sigma, Deisenhofen
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Beverly bzw. Gibco BRL, Eggenstein
<i>Taq</i> -Polymerase	
<i>Xho</i> I	New England Biolabs, Beverly

### 1.1.4 Oligonukleotide

für die heterologe Expression:

dokA 3' RR129      5'-CCG CTC GAG CTA TTA ACC ATT TTC ATC AGT TTT AAT C-  
3'

dokA 5BN KKY      5'-CGC GGA TCC ATA TGA AGA AAT ATA TTT TAG TTG CAG-3'  
RR dokA GST 3'      5'-GCC CTC GAG TTA ATC GTC ATT CTT TTC-3'

für die Sequenzierung:

dokA4723 rev      5'-CAT CCS TTT GAG GCA TTT GAC-3'

für die homologe Expression und RT-PCR:

RR dokA fwd RT      5'-ATA ATT GGA AGT TTT CCA ATT TGT TTA AT-3'  
RR dokA rev RT      5'-TTT GAC GTA AAA TAG TGG AAC ATG TGA-3'  
RR dhkA 5'      5'-CGG AAT TCA AAA ATG TTA CAA CCG CCA GCA TAT-3'  
RR dhkA 3'      5'-CGG AAT TCC GTT AAT TAT TAT AAC CAC CCC ATT TTG C-  
3'  
RR ssg478 5'      5'-CGG AAT TCA AAA ATG CAA GAT CCA TCG AAA TTA-3'  
RR ssg478 3'      5'-CGG AAT TCC GTT AAC TTA ATT TAT AAA GAC TAT AAG  
CAC T-3'  
RR dhkD 5'      5'-CGG AAT TCA AAA ATG TCA CAA GAA AAT ATA CAT-3'  
RR dhkD 3'      5'-CGG AAT TCC GTT AAT TAA TTC TTG AAG ATC TGT ATT T-  
3'  
RR skl607 5'      5'-CGG AAT TCA AAA ATG AAT AAG AAT TTA TTA GGT-3'  
RR skl607 3'      5'-CGG AAT TCC GTT ATT GAG AGT TTG CTT TTT TAC AAG G-  
3'  
RR ssa688 5'      5'-CGG AAT TCA AAA ATG CAT AAA GCT TTC CCT CAA-3'  
RR ssa688 3'      5'-CGG AAT TCC GTT AAT TAC GAA TAT TTA AAT TCA TTA A-  
3'  
RR ssi667 5'      5'-CGG AAT TCA AAA ATG AAT AAT GAT AAT AAT TAT-3'

RR ssi667 3'            5'-CGG AAT TCC GTT ATT GAT CTT TAT TAA AAA CTA ATT T-  
3'  
RR ssk767 5'            5'-CGG AAT TCA AAA ATG ACA GGA ATA AGG TAT CCT-3'  
RR ssk767 3'            5'-CGG AAT TCC GTT ATA AAA CCG CAC ATA AAC ACA CTC T-  
3'

### 1.1.5 Antibiotika

Ampicillin, Na-Salz	Roche, Mannheim
Blasticidin S Hydrochlorid	ICN, Eschwege
Chloramphenicol	ICN, Eschwege
Geneticin (G418)	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Serva, Heidelberg

### 1.1.6 Reagenzien

8-Bromo-cAMP	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Biomol, Hamburg
ATP	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco, Detroit
Bacto-Trypton	Difco, Detroit
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford
Benzamidin Hydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Biotrak Isotopenverdünnungs-Assay	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
cAMP	Sigma, Deisenhofen
cAMP-S	Biolog, Bremen
Coomassie Brilliantblau R-250	Serva, Heidelberg

Desoxyribonukleotide (dNTPs)	PEQlab, Erlangen
Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt
DNA-Längenstandard	Gibco BRL, Eggenstein
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Riedel-de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
foetales Kälber Serum	Gibco BRL, Eggenstein
Glucose	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Oxoid, Basingstoke
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Gerbu
Methanol	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Pepton	Oxoid, Basingstoke
Proteaseinhibitor-Mischung Complete	Boehringer, Mannheim
Protein-Größenstandards	Sigma, Deisenhofen
Protein-Größenstandards, vorgefärbt	Novex
Protogel	National Diagnostics, Atlanta
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
<i>Renaissance</i> Chemilumineszenz-Reagenz	Du Pont, Bad Homburg
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

Roti-Load, reduzierend	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Gibco BRL, Eggenstein
Salzsäure, 37%	Riedel-de Haën, Seelze
Silbernitrat	Riedel-de Haën, Seelze
Sorbit	Merck, Darmstadt
Standardisierte Pansorbin Zellen	Calbiochem, Frankfurt
Szintillationscocktail Rotiszint Eco Plus	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris	Riedel-de Haën, Seelze
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Triton X-114	Sigma, Deisenhofen
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
-[ <sup>32</sup> P]-ATP	ICN, Eschwege

### 1.1.7 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammern	Eigenbau des MPI f. Biochemie, Martinsried
ÄKTApurifier 100	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Blot-Apparatur Trans-Blot SD	BioRad, Urbana
DNA Sequenzer 377	Applied Biosystem, Weiterstadt
Elektroporationsgerät Gene Pulser	BioRad, Urbana
Fraktionssammler	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Kühlzentrifuge SIGMA 4K15	Sigma, Osterode
Peristaltik-Pumpe P1	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg



ResourceQ Anionenaustauschersäule	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Röntgenfilm-Entwickler	Kodak, Stuttgart
Kodak M35 RP X-OMAT Processor	
SDS-Gel-Gießkammer	Hoefer / Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SDS-Gellaufkammer SE250 Mighty Small II	Hoefer / Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sorvall Zentrifuge RC-5C Plus	Du Pont, Bad Homburg
Spannungsgeber EPS 200	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Speed Vac Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Szintillationszähler	Packard
Szintillationszähler LS 7500	Beckmann
Thermocycler CETUS	Perkin Elmer
Thermocycler Gene Amp 9600	Perkin Elmer
Tischzentrifuge Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge TGA-65	Kontron Inst., Mailand
UV-Durchflußphotometer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
UV/VIS Spektralphotometer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ultrospec 3000	
Vakuum-Geltrockner Model 543	BioRad, Urbana
Zentrifuge Rotixa 120 R	Hettich
Zentrifuge Avanti J25 mit dem Rotor JA10.500	Beckmann

Die übrigen verwendeten Geräte und Materialien sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

## 1.1.8 Sonstige Materialien

0,22 µm Sterilfilter	Millipore, Eschborn
3 MM Filterpapier	Whatman, Maidstone
Centricon-10 Konzentrator	Amicon, Witten
Centriprep-10 Konzentrator	Amicon, Witten
Elektroporationsküvetten 2 mm	Biorad, München
Elektroporationsküvetten 4 mm	Biorad, München
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Becton-Dickinson, San Jose
Gewebekulturflaschen 156502	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturschalen Ø 100 mm	Greiner, Frickenhausen
Glutathion Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Micro-Spin G50 Säulen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein A-Sepharose CL-4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
PVDF-Membran	Pall, Dreieich
Röntgenfilm Curix HT1.000G	Agfa Gevaert, Leverkusen
Röntgenfilm X-omat AR-5	Kodak, Stuttgart
sterile Einfrierröhrchen, 2 ml	Roth, Karlsruhe
Thoma-Zellzählkammer	Brand,
XK-16-Säule	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

## 1.1.9 Puffer

gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung4,1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25°C)Bradford Reagenz

0,01 % w/v Coomassie Brilliantblau G-250

5 % v/v Ethanol

8,5 % v/v Phosphorsäure

Coomassie-Entfärbelösung für SDS-Gele

25 % v/v Ethanol

8 % v/v Eisessig

Coomassie-Entfärbelösung für Western Blots

50 % v/v Methanol

7,5 % v/v Eisessig

Coomassie-Färbelösung für SDS-Gele

0,1 % w/v Coomassie Brilliantblau R-250

25 % v/v Ethanol

8 % v/v Eisessig

Coomassie-Färbelösung für Western Blots

0,1 % w/v Coomassie Brilliantblau R-250

50 % v/v Methanol

7,5 % v/v Eisessig

2x CSK-Puffer

20 mM KCl

20 mM EGTA

20 mM Imidazol

4 mM MgCl<sub>2</sub>

ad pH 7,0 HCl

Complete Protease Inhibitor Cocktail

2 % v/v Triton X-114

Dialysepuffer für Antikörperreinigung

100 mM Tris/HCl, pH 8,9

*D. discoideum* Elektroporationspuffer

60 % v/v SPB

50 mM Saccharose

sterilfiltriert

DNaseI-Stammlösung

200 mg/ml DNase I  
0,4 M Tris/HCl, pH 7,9  
0,1 M NaCl  
0,1 M CaCl<sub>2</sub>  
60 mM MgCl<sub>2</sub>

6x DNA-Probenpuffer

20 mM Tris, pH 7,5  
50% v/v Glycerin  
0,25 % w/v Bromphenolblau  
2 % v/v gesättigte Xylencyanollösung

Elutionspuffer für Antikörperreinigung

0,1 M Zitronensäure/NaOH, pH 3,5

Entwickler (Silberfärbung)

2,5 % w/v Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
0,01 % v/v Formaldehyd

Fixierlösung (Silberfärbung)

40 % v/v Ethanol  
10 % v/v Essigsäure

Inkubationslösung (Siberfärbung)

30 % v/v Ethanol  
0,5 M Natriumacetat  
0,5 % v/v Glutaraldehyd  
0,2 % w/v Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O

Konservierungslösung

5 % v/v Glycerin  
25 % v/v Ethanol  
entgast

Laemmli-Auftragspuffer

62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8

10 % v/v Glycerin  
2 % w/v SDS  
5 % v/v 2-Mercaptoethanol  
0,01 w/v Bromphenolblau

Natriumphosphat-Puffer

20 mM Natriumphosphat, pH 6,8

10x PBS

80 g NaCl  
2 g KCl  
14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
H<sub>2</sub>O ad 1 l  
HCl ad pH 7,2

PDE-Reaktionspuffer

25 mM Tris/HCl, pH 7,5  
4 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM NaN<sub>3</sub>

Phosphorylierungspuffer

50 mM Tris/HCl, pH 8.3  
50 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 % v/v Glycerin

Resuspensionspuffer für Bakterien-Zellpellets

50 mM Tris/HCl, pH 7,5 bzw. 8,3  
150 mM NaCl  
Protease-Inhibitor-Mischung  
1 mM DTT  
1 mg/ml Lysozym  
0,8 % v/v DNase I-Stammlösung

Saccharose-Lysepuffer

30% (w/v) Saccharose  
40 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

0,4 mM DTT  
0,02% (w/v)  $\text{NaN}_3$   
Proteaseinhibitor-Mischung Complete  
sterilfiltrieren

5x SDS-Gelelektrophoresepuffer

125 mM Tris  
0,96 M Glycin  
0,5% w/v SDS

Sammelgelpuffer für SDS-PAGE

4 ml Protogel-Lösung  
7,5 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8  
18,3 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
30  $\mu\text{l}$  TEMED  
150  $\mu\text{l}$  10 % w/v  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

Trenngelpuffer für SDS-PAGE

Gel	10 % Polyacrylamid	12,5 % Polyacrylamid	15 % Polyacrylamid
Protogel-Lösung	20 ml	25 ml	30 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	15 ml	15 ml	15 ml
$\text{H}_2\text{O}$	24,6 ml	19,6 ml	14,6 ml
TEMED	60 $\mu\text{l}$	60 $\mu\text{l}$	60 $\mu\text{l}$
10 % w/v $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	300 $\mu\text{l}$	300 $\mu\text{l}$	300 $\mu\text{l}$

Silberfärbelösung

0,1 % w/v  $\text{AgNO}_3$   
0,02 % v/v Formaldehyd

Stopplösung (Silberfärbung)

1,0 % w/v Glycin

Soerensen Phosphat Puffer (SPB), pH 6,0

15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

2,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
autoklavieren

50x TAE-Puffer

2 M Tris  
57,1 ml Essigsäure  
100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0  
mit H<sub>2</sub>O ad 1 l

Puffer für TB-Medium

0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
autoklaviert

10x TBS

80 g NaCl  
2 g KCl  
30 g Tris  
H<sub>2</sub>O ad 1 l  
HCl ad pH 7,5

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 7,4  
1 mM EDTA, pH 8,0

Transferpuffer für Westernblot

150 mM Glycin  
20 mM Tris  
0,05 % w/v SDS  
10% v/v Methanol

Waschpuffer für Antikörperreinigung

100 mM Tris/HCl, pH 8,9  
3 M NaCl

Waschpuffer für GST Fusionsproteine

50 mM Tris/HCl, pH 7,5 bzw. 8,3  
150 mM NaCl

### 1.1.10 Medien

Alle Medien wurden bei 120°C autoklaviert

#### D. discoideum Medien:

##### AX-Medium

14,3 g Pepton  
7,15 g Hefeextrakt  
18,0 g Maltose  
0,62 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
0,49 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 $\text{H}_2\text{O}$  ad 1 l

##### SM-Agarplatten

20 g Bacto-Agar  
10 g Pepton  
10 g Glucose  
1 g Hefeextrakt  
1 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
2,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
1g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
 $\text{H}_2\text{O}$  ad 1 l

##### Normal-Agarplatten

20 g Bacto-Agar  
1 g Pepton  
1 g Glucose x  $\text{H}_2\text{O}$   
SPB ad 1 l

##### Normal-Agarplatten mit cAMP-S

20 g Bacto-Agar  
1 g Pepton  
1 g Glucose x  $\text{H}_2\text{O}$   
SPB-Puffer ad 1 l



beim Erkalten des autoklavierten Agars auf ca. 50 °C 2 µM cAMP-S zugeben

#### Phosphat-Agarplatten

15 g Bacto-Agar  
SPB-Puffer ad 1 l

#### *E. coli* Medien

##### Luria-Bertani (LB)-Medium

10 g Bacto-Trypton  
5 g Hefeextrakt  
10 g NaCl  
H<sub>2</sub>O ad 1 l

##### SOB-Medium

20 g Bacto-Trypton  
5 g Hefeextrakt  
0,5 g NaCl  
10 ml 250 mM KCl  
5 ml 2 M MgCl<sub>2</sub>  
H<sub>2</sub>O ad 1 l

##### SOC-Medium

1 l SOB-Medium  
20 ml 1 M Glucose (sterilfiltriert)

##### TB-Medium (Terrific broth)

36 g Bacto-Trypton  
72 g Hefeextrakt  
12 ml Glycerin, 87 %  
H<sub>2</sub>O ad 2,7 l  
nach Autoklavieren:  
300 ml Puffer für TB-Medium

#### LB-Agarplatten

10 g Bacto-Trypton  
5 g Hefeextrakt  
10 g NaCl

15 g Bacto-Agar

H<sub>2</sub>O ad 1 l

LB Amp-Medium und LB Amp Agarplatten enthielten gegebenenfalls 50 µg/ml Ampicillin und/oder 30 µg/ml Chloramphenicol.

## 1.2 Zellbiologische Methoden

### 1.2.1 Anzucht von *D. discoideum*-Zellen auf Agarplatten

30 ml LB-Medium wurden mit *Klebsiella aerogenes*-Zellen beimpft und bei 37 °C und 250 Upm geschüttelt. Je 100 µl dieser ÜN-Kultur wurden auf trockenen SM-Agarplatten ausgestrichen. Danach wurden *D. discoideum*-Zellen dazugegeben und mit einem Spatel vorsichtig verteilt. Die Platten wurden 3-4 Tage bei 21 °C inkubiert.

### 1.2.2 Adhäsive Zucht von *D. discoideum*-Zellen in Gewebekulturschalen

Zur Anzucht und kurzzeitigen Lagerung (bis etwa 14 Tage) wurden *D. discoideum*-Zellen in Gewebekulturschalen unter 10 ml AX-Medium in Gegenwart von Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) gehalten. Dabei wurde alle 2-4 Tage frisches Medium zugegeben, wobei ein Großteil der Zellen durch Abspülen mit Medium entfernt wurde. Diese Zellen wurden gegebenenfalls zur weiteren Anzucht in Schüttelkultur verwendet.

### 1.1.3 Anzucht von *D. discoideum*-Zellen in Schüttelkultur

Zur Anzucht von *D. discoideum* in Schüttelkultur wurden Zellen in 30 ml (in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben) bzw. 300 ml AX-Medium (in einem 1 l-Erlenmeyerkolben) angeimpft. Dabei sollte die Mindestzellzahl beim Animpfen über  $3 \cdot 10^4$  Zellen/ml liegen. Die Zellen wurden bei

21 °C und 150 Upm inkubiert. Für zellbiologische Untersuchungen wurden Kulturen mit  $1\text{-}5 \cdot 10^6$  Zellen/ml verwendet. Als Selektionsmarker wurden Geneticin und Blasticidin S eingesetzt, bzw. die Uracil-Prototrophie der von DH1 abstammenden Mutanten ausgenutzt. Die Zelldichte wurde in einer Thoma-Zählkammer bestimmt.

#### 1.1.4 Konservierung von *D. discoideum*-Sporen

Axenisch gewachsene Zellen wurden bei 800 g und 4 °C für 3 min in einer Hettich Zentrifuge pelletiert. Das Zellpellet wurde zweimal in eiskaltem SPB gewaschen, mit SPB auf  $1\text{-}2 \cdot 10^7$  Zellen/ml eingestellt und 3-5 ml davon auf eine trockene Phosphat-Agarplatte gegeben. Die Platte wurde 30 min stehen gelassen. Der Puffer wurde danach mit einer Pipette vorsichtig abgezogen und die Platte mindestens 30 h bei 21 °C inkubiert. Die entwickelten Fruchtkörper wurden mit 5 ml eiskaltem SPB von der Platte abgespült. 1 ml-Aliquots wurden auf Einfrierröhrchen verteilt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Röhrchen wurden bis zu 2 Jahre bei -70 °C gelagert.

Zum Ansetzen wurde ein Einfrierröhrchen rasch aufgetaut und die Sporensuspension in eine Gewebekulturschale mit 10 ml AX-Medium gegeben.

#### 1.1.5 Konservierung von *D. discoideum*-Zellen

Axenisch gewachsene Zellen wurden bei 800 g und 4 °C für 3 min in einer Hettich Zentrifuge pelletiert und mit Einfriermedium (AX-Medium + 2 % v/v autoklaviertem DMSO) auf eine Dichte von  $1\text{-}3 \cdot 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde rasch in 1 ml-Aliquots auf Einfrierröhrchen verteilt, für 2-3 h auf -20 °C gebracht und anschließend bei -70°C gelagert.

Zum Ansetzen wurde ein Aliquot rasch aufgetaut, sofort in 10 ml eiskaltem AX-Medium überführt und die Zellen in einem Falcon-Röhrchen 2 min bei 500 g und 4 °C abzentrifugiert. Das

Zellpellet wurde erneut in 10 ml AX-Medium aufgenommen und in eine Gewebekulturschale gegeben. Alternativ wurde das Zellpellet in nur 2 ml SPB aufgenommen und vorsichtig auf zwei mit *Klebsiella aerogenes* ausgestrichene SM-Agarplatten verteilt.

#### 1.1.6 Entwicklung von *D. discoideum*-Zellen auf Phosphatagar

Axenisch gewachsene Zellen wurden wie unter 5.2.4 beschrieben geerntet und auf Phosphatagar gebracht. Die entwickelten Fruchtkörper wurden nach etwa 36 h fotografiert.

#### 1.1.7 Entwicklung von *D. discoideum*-Zellen auf cAMP-S-haltigem Normalagar

100 µl einer in AX-Medium bei 37 °C und 250 Upm dichtgewachsenen *E.coli* B/2-Kultur wurde auf einer maximal 24 h alten cAMP-S haltigen Normal-Agarplatte ausgestrichen. Nach ca. 1 h Trocknen wurden 20 µl einer auf  $1-2 \cdot 10^7$  Zellen/ml eingestellten *D. discoideum*-Zellsuspension in SPB punktförmig aufgebracht und die Platten bei 21 °C inkubiert. Nach zwei Tagen war im Bakterienrasen ein Fressrand um den Bereich, in dem die *D. discoideum*-Zellen aufgetragen wurden, zu erkennen. Nach drei Tagen wurde die entstandenen "Plaques" auf die Ausformung mehrzelliger *D. discoideum*-Zellaggregate untersucht und fotografiert. Parallel wurden *D. discoideum*-Zellen auf Normal-Agar ohne cAMP-S ausgebracht.

#### 1.1.8 Transformation von *D. discoideum*-Zellen

Eine axenisch gewachsenene *D. discoideum*-Kultur wurde zweimal in eiskaltem SPB und einmal in eiskaltem Elektroporationspuffer gewaschen. Die Zellen wurden mit Elektroporationspuffer auf  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml eingestellt. 0,8 ml dieser Suspension wurde auf Eis mit 10-20 µg Plasmid-DNA gemischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten mit einer Dicke von 4 mm gegeben. Die

Elektroporation wurde bei einer Kapazität von 3  $\mu\text{F}$  und einer Spannung von 1,0 kV ohne “Capacitance Extender” und “Pulse Controller” durchgeführt. Nach einer 10-minütigen Inkubation der Küvette auf Eis wurde die Suspension ins Zentrum einer Gewebekulturschale mit je 4  $\mu\text{l}$  einer 100 mM  $\text{MgCl}_2$ -Lösung und einer 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gegeben. Die Zellen wurden 20 min bei 100 Upm und 21 °C geschüttelt, bevor 10 ml AX-Medium zugegeben wurde. Dieses Medium enthielt 100 IU/ml Penicillin und 100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin. 24 h später wurde 10  $\mu\text{g/ml}$  Geneticin G418 zugegeben. Bis zum sichtbaren Wachstum von Kolonien nach 4-20 Tagen wurde alle 3-5 Tage das Medium gewechselt, um tote Zellen zu entfernen.

#### 1.1.9 Sorbitschock in Flüssigkultur (Schuster *et al.*, 1996)

Eine axenisch gewachsene *D. discoideum*-Kultur wurde zweimal mit eiskaltem SPB-Puffer gewaschen, mit SPB-Puffer auf  $3 \cdot 10^7$  Zellen/ml eingestellt und 60 min bei Zimmertemperatur und 150 Upm geschüttelt. Danach wurde die Suspension durch Zugabe von 2 M Sorbit in SPB auf 400 mM Sorbit gebracht (finale Osmolalität in der Suspension: 430 mOsm). Als Kontrolle wurde eine Zellsuspension unter denselben Bedingungen in SPB ohne Sorbit geschüttelt (Osmolalität in dieser Suspension: 34 mOsm).

#### 1.1.10 Bestimmung der Überlebensrate nach hyperosmotischem Schock

Axenisch gewachsene *D. discoideum*-Zellen wurden mit Sorbit wie unter 5.2.9 beschrieben hyperosmotisch geschockt. Nach 120 min wurden 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension entnommen und in 20 ml SPB resuspendiert. Je 12,5  $\mu\text{l}$  dieser Suspension wurden mit 150  $\mu\text{l}$  einer dicht gewachsenen *K. aerogenes*-Suspension in SPB auf trockenen SM-Agarplatten ausgestrichen. Auf jede Platte wurden so etwa 150 *D. discoideum*-Zellen verteilt. Da die Streuung des Tests relativ groß ist, wurden jeweils 5 Platten ausgestrichen. Drei Tage später wurde die Anzahl der Fresslöcher

(Plaques) im Bakterienrasen ausgezählt. Als Kontrolle dienten Zellen, denen statt Sorbitlösung dasselbe Volumen an SPB zugegeben wurde.

#### 1.1.11 Bestimmung der Überlebensrate nach hyperosmotischem Schock mit Nukleotidzugabe

Axenisch gewachsene *D. discoideum*-Zellen wurden wie unter 5.2.9 beschrieben gewaschen und eingestellt. Nach 60 min in SPB wurde die Suspension mit 1,25 M 8-Br-cAMP bzw. cAMP auf die jeweilige Nukleotidkonzentration und anschließend sofort mit 2 M Sorbitlösung auf 400 mM Sorbit eingestellt. Nach 10 min Inkubation wurde die Zellsuspension in 15 ml-Falcon-Röhrchen bei 800 g für 2 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet im selben Volumen 400 mM Sorbit in SPB ohne Nukleotid resuspendiert. Die Zellen schüttelten weitere 110 min, bevor sie wie unter 5.2.10 beschrieben verdünnt, ausplattiert und 3 d später zur Ermittlung der Überlebensrate ausgezählt wurden.

#### 1.1.12 Bestimmung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen

Axenisch gewachsene Zellen wurden bei 800 g und 4 °C für 3 min in einer Hettich-Zentrifuge pelletiert. Das Zellpellet wurde zweimal in eiskaltem SPB gewaschen, mit SPB-Puffer auf  $3 \cdot 10^7$  Zellen/ml eingestellt, auf zwei Kolben verteilt und 50 min geschüttelt. Nun wurden aus jedem Kolben 3-4 Aliquots à 833 µl entnommen, für 8 s bei 4000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet sofort in 200 µl eiskalter 3,5 %iger  $\text{HClO}_4$  resuspendiert. Diese Suspension wurde 30-45 min auf Eis gelagert. Nach insgesamt 60 min in SPB wurde durch Zugabe von 2 M Sorbitlösung in SPB die Sorbitkonzentration der Zellsuspension auf 400 mM eingestellt. Dies geschah, wie auch die anschließende Probenentnahme in beiden Kolben im Abstand von 60 s, um je 2 Proben für jeden Zeitpunkt zu erhalten. Jeweils 20 s vor dem jeweiligen

Zeitpunkt zu dem die Messung erfolgen sollte, wurde ein Aliquot à 1041 µl aus der Zellsuspension entnommen und wie oben beschrieben behandelt. Nach der Inkubation auf Eis wurden die Proben mit je 100 µl einer bei Zimmertemperatur gesättigten  $\text{KHCO}_3$ -Lösung neutralisiert und das entstehende Kohlendioxid vorsichtig entströmen lassen. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C und 20000 g mehrere Minuten zentrifugiert und 200 µl des Überstandes bis zur Bestimmung der cAMP-Konzentration bei -20 °C gelagert.

Die cAMP-Bestimmung erfolgte mit dem Biotrak Isotopenverdünnungs-Assay, es wurden jedoch 200 µl statt der vorgesehenen 50 µl Probenlösung eingesetzt. Zu der auf Eis aufgetauten Probe wurden 50 µl 8-[ $^3\text{H}$ ]-cAMP-Lösung und 100 µl der cAMP-Bindeprotein-Lösung pipettiert. Nach kurzem Vortexen ließ man die Lösungen 2 h auf Eis, damit sich ein für das Verhältnis aus  $^3\text{H}$ -markiertem und nicht markiertem cAMP in der Lösung repräsentatives Maß an das Bindeprotein anlagert. Die Proben wurden anschließend mit je 100 µl einer Aktivkohle-Suspension versetzt, um ungebundenes cAMP durch Adsorption aus der Lösung zu entfernen, und die Aktivkohle nach 1-3 min abzentrifugiert. 350 µl des Überstandes, der Bindeprotein und daran gebundenes cAMP enthielt, wurde in 10 ml Szintillationslösung pipettiert, geschüttelt und am Szintillationszähler zweimal je 2 min vermessen.

Die Bestimmung der eingesetzten cAMP-Menge erfolgte anhand einer Eichgerade, die für jede neue Assay-Charge erneut ermittelt wurde. Dazu wurden zweimal je 50 µl der Standardlösungen, die 0, 1, 2, 4, 8 und 16 pmol cAMP entsprachen mit 50 µl Tris/EDTA-Puffer und 100 µl 7 %iger  $\text{HClO}_4$  versetzt, mit 100 µl gesättigter  $\text{KHCO}_3$ -Lösung neutralisiert, zentrifugiert und 200 µl des Überstands der cAMP-Bestimmung zugeführt. Die Ermittlung des Hintergrundes erfolgte mit der Standardlösung für 0 pmol cAMP und 100 µl Tris/EDTA-Puffer anstelle der Bindeprotein-Lösung.

Die Werte aus den Doppelbestimmungen wurden gemittelt. Für jeden Wert wurden mindestens drei, bei den Nullwerten mindestens zehn Doppelbestimmungen durchgeführt, die Standardabweichung aus diesen Daten ermittelt und als Fehlermargen aufgetragen.

### 1.1.13 Bestimmung der Gesamt-cAMP-Konzentration

Axenisch gewachsene Zellen wurden wie unter 5.2.12 beschrieben gewaschen und eingestellt. Nach 50 min wurden 500 µl der Zellsuspension entnommen, mit demselben Volumen eiskalter 7 %iger  $\text{HClO}_4$  gemischt und während der weiteren Probenentnahme auf Eis gelagert. 2 min später wurde die Zellsuspension mit 0,5 M DTT-Lösung auf 20 mM DTT eingestellt, weitere 6 min später mit 2 M Sorbit in SPB auf 400 mM Sorbit. Währenddessen und im Anschluss daran wurde zum jeweiligen Zeitpunkt das entsprechende Volumen (520 µl nach der DTT-Zugabe, 650 µl nach der Sorbit-Zugabe) entnommen, 1:1 mit 7 %iger  $\text{HClO}_4$  gemischt und auf Eis gestellt. Dem zweiten Kolben, bei dem statt Sorbitlösung dasselbe Volumen SPB zugegeben wurde, wurden entsprechend die Referenzproben entnommen. Nach der Inkubation auf Eis wurden 400 µl der durch Vortexen resuspendierten Proben mit je 200 µl einer bei Zimmertemperatur gesättigten  $\text{KHCO}_3$ -Lösung neutralisiert und das entstandene Kohlendioxid vorsichtig entströmen lassen. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C und 20000 g mehrere Minuten zentrifugiert und je 2 Aliquots à 200 µl des Überstands zur Bestimmung der cAMP-Konzentration entnommen. Diese erfolgte wie unter 5.2.12 beschrieben. Für jeden Wert wurden mindestens drei Doppelbestimmungen durchgeführt, die Standardabweichung aus diesen Daten ermittelt und als Fehlermargen aufgetragen.

### 1.1.14 Parallele Bestimmung intra- und extrazellulärer cAMP-Konzentration

Die unter 5.2.13 beschriebene Methode wurde geringfügig abgewandelt, um in derselben Messung zwischen intra- und extrazellulärem cAMP zu unterscheiden. Die entnommenen 500 µl der Zellsuspension wurden 8 s bei 17 °C und 4000 g zentrifugiert, der Überstand zu 500 µl eiskalter 7 %iger  $\text{HClO}_4$  gegeben, das Zellpellet sofort in 400 µl eiskalter 3,5 %iger  $\text{HClO}_4$  resuspendiert. Die Proben wurden anschließend wie unter 5.2.13 beschrieben neutralisiert und auf ihren cAMP-Gehalt untersucht.



### 1.1.15 Herstellung kompetenter *E. coli*-Stämme

Eine dicht gewachsene *E. coli*-Vorkultur wurde 1/100 in 500 ml LB-Medium überimpft. Anschließend wurde die Kultur bei 37 °C und 200 Upm so lange geschüttelt, bis die OD<sub>600 nm</sub> der Suspension 0,5 betrug. Die Zellen wurden 20 min in der Hettich-Zentrifuge bei 4 °C und 3700 g abzentrifugiert und nacheinander mit 500, 250 und 50 ml steriler 10%iger Glycerinlösung (autoklaviert) gewaschen. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis mit vorgekühlten Zentrifugenbechern und Pipetten durchgeführt. Die Zellen wurden in 0,5-1 ml 10%iger Glycerinlösung resuspendiert, zu je 70 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -70 °C gelagert.

### 1.1.16 Transformation von Plasmiden in kompetente *E. coli*-Stämme

35 µl einer Suspension kompetenter *E. coli*-Zellen wurde 20 min auf Eis aufgetaut, mit 0,3-2 µl Plasmidlösung gemischt und 60 s auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde dann in vorgekühlte Elektroporationsküvetten mit einer Dicke von 2 mm gegeben und die Elektroporation bei einer der folgenden Bedingungen durchgeführt: Kapazität 25 µF, Spannung 1,5 kV, Widerstand 800 bzw. Spannung 2,5 kV, Widerstand 200 . Die transformierten Zellen wurden möglichst schnell in 2 ml SOC-Medium resuspendiert und 45 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden bei Ligationsansätzen 50-200 µl, bei bereits ligierten Plasmiden 5-15 µl der Zellsuspension auf trockene LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C ÜN inkubiert.

## **1.3 Molekularbiologische Methoden**

### **1.3.1 Enzymatische Modifikation von DNA**

#### Restriktionsspaltung

Die Restriktionsspaltung von DNA erfolgte in einem Volumen von 15-200 µl unter den von New England Biolabs bzw. Roche angegebenen Bedingungen. Um 1 µg DNA zu spalten wurde 1-20 U Restriktionsendonuklease eingesetzt.

#### Ligation

Für einen Ligationsansatz von 10 µl wurden etwa 200 µg DNA eingesetzt. Sollte ein Vektor mit einem DNA-Fragment ligiert werden, wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Fragment von 1:3 bis 1:10 eingesetzt.

#### Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung der Phosphatgruppen am 5'-Ende von linearer Vektor-DNA verhindert die Religation. Die Phosphatase aus Kälberdarm wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers eingesetzt. Die Entfernung des Enzyms nach der Reaktion erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 5.3.2) mit nachfolgender Elution des Vektorfragments aus der Agarose, wie unter 5.3.3 beschrieben.

### **1.3.2 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über horizontale Agarose-Gelelektrophorese. Die dafür verwendeten Gele enthielten je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 0,7-1,5 % w/v Agarose in TAE-Puffer. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 6x Probenpuffer gemischt. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer bei 50-70 V durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden durch Inkubieren des Geles für 30 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml in

TAE-Puffer) gefärbt und mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Die Größe der Fragmente wurde über den Vergleich mit einem DNA-Längenstandard bestimmt.

### 1.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren wurden die Gelblöcke, die die mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemachten Banden enthielten, ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert.

### 1.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Diese Methode wurde benutzt um DNA-Fragmente spezifisch zu amplifizieren. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Dabei wurden 30-35 Zyklen durchgeführt, wobei jeder Zyklus aus den drei Phasen DNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung ("Annealing") und DNA-Verlängerung bestand. Dabei wurde die Annealing-Temperatur durch die Programme "MacVector 4.1.1", "GCG", Versionen 9.1 und 10.0 (University of Wisconsin), oder wie folgt aus der Sequenz des Primers berechnet:

$$\text{Annealing-Temperatur } [^{\circ}\text{C}] = 2 \times \text{Anzahl (A+T)} + 4 \times \text{Anzahl (G+C)} - 4$$

Die Zeit der Verlängerung wurde mit 1 min/kb DNA angesetzt und gegebenenfalls aufgerundet.

Standardprofil einer PCR-Reaktion:

1. Denaturierung	96 °C	5 min
2. Denaturierung	96 °C	30 s
3. Annealing		30 s
4. Verlängerung	65°C/72°C <sup>1)</sup>	1 min/kb

Schritt 2-4: 30-35 Zyklen

1) Die Verlängerungstemperatur wurde in Abhängigkeit des A/T-Gehaltes der zu amplifizierenden DNA gewählt. *D. discoideum* DNA mit ihrem hohen A/T-Gehalt wurde bei 65 °C verlängert, während DNA aus *E. coli* bei 72 °C amplifiziert wurde.

Ein Standardansatz enthielt folgende Komponenten:

Template-DNA	20-100 ng
Primer 1	50 pmol
Primer 2	50 pmol
dNTP-Stammlösung	1 µl
10x <i>Taq</i> -Polymerasepuffer <sup>2)</sup>	5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

2) bei schlecht funktionierenden PCR-Reaktionen wurde eine Optimierung des Puffers durchgeführt. Es wurden folgende 9 verschiedene 10x Polymerase-Puffer getestet, die sich in ihrem pH-Wert und ihrer Magnesiumkonzentration unterschieden:

1. 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,0	2. 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,5	3. 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 9,0
4. 25 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,0	5. 25 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,5	6. 25 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 9,0
7. 35 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,0	8. 35 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,5	9. 35 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 9,0

Basiszusammensetzung aller 9 Puffer:

0,5 M KCl

100 mM Tris

0,01% Gelatine

Zusammensetzung der dNTP-Stammlösung:

je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

### 1.3.5 Reinigung von PCR-Produkten

Für die Reinigung von PCR-Produkten wurde die DNA aus dem PCR-Ansatz unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

### 1.3.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Dabei wurden basenspezifisch fluoreszenz-markierte Didesoxynukleotide verwendet (PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Detektion und Auswertung der Signale erfolgte an einem DNA-Sequencer.

Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt.

Reaktionsansatz:

DNA-Vorlage	0,5 µg
Sequenzierungs-Primer	10 pmol
Reaktions-Mix	4 µl
H <sub>2</sub> O	ad 15 µl

Der Reaktionsmix (vom Hersteller gebrauchsfertig geliefert) enthielt DNA-Polymerasepuffer, dNTPs, fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide und eine thermostabile DNA-Polymerase.

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung	96 °C	30 sec
Primer-Annealing	<sup>3)</sup>	30 sec
Verlängerung	60 °C	4 min
30 Zyklen		

3) Die Primer-Annealing-Temperatur wurde durch die Programme “MacVector 4.1.1” oder “GCG”, Versionen 9.1 und 10.0 (University of Wisconsin), bzw. wie folgt aus der Sequenz des Sequenzierungsprimers berechnet:

$$\text{Annealing-Temperatur [}^{\circ}\text{C]} = 2 \times \text{Anzahl (A+T)} + 4 \times \text{Anzahl (G+C)} - 4$$

Nach der Sequenzierungsreaktion wurden der Ansatz über MicroSpin G-50 Säulen gereinigt. Dazu wurden die geöffneten Säulen bei 2000 g für 1 min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Anschließend wurde der Sequenzierungsansatz aufgetragen und wiederum 1 min bei 2000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde nachfolgend in einem Speed Vac Concentrator getrocknet. Der Ansatz wurde anschließend nach den Protokollen des Herstellers am DNA Sequenzer analysiert und mit dem Programm “Sequence Navigator” (ABI, Weiterstadt) ausgewertet.

### 1.3.7 Plasmidisolierung aus *E. coli*-Stämmen

3-5 ml einer ÜN Kultur von *E. coli*-Zellen wurden 10 min bei 7000 g pelletiert. Das Pellet wurde in 250 µl 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA resuspendiert und mit 250 µl 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS gemischt. Danach wurden 250 µl 3,0 M Kaliumacetat zugegeben, die Suspension durch vorsichtiges Drehen des Reaktionsgefäßes gemischt und 10 min bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,0 und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gemischt. Das Reaktionsgefäß wurde 1 h oder ÜN auf -20 °C gestellt und danach bei 20000 g für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst und bei -20 °C gelagert.

Um Plasmide hoher Reinheit zu isolieren, wurden der QIAprep Spin Miniprep Kit und der QIAGEN Plasmid Midi Kit nach den Protokollen des Herstellers verwendet.

### 1.3.8 Isolierung genomischer DNA aus *D. discoideum*-Zellen

Axenisch gewachsene Zellen wurden auf Phosphat-Agarplatten oder SM-Agarplatten entwickelt. Pro DNA-Isolierungsansatz wurden 5 Agarplatten verwendet. Die Platten wurden mit eiskaltem SPB abgespült, die Sporen bei 800 g für 3 min pelletiert und zweimal mit eiskaltem SPB gewaschen. Das Pellet wurde in 50 ml Kernlysepuffer resuspendiert und die Suspension 10 min bei 6000 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in SDS-Lysepuffer (0,7 % w/v SDS in TE-Puffer) aufgenommen. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K-Stammlösung (25 mg/ml) wurde die Probe mindestens 8 h bei 60 °C im Wasserbad leicht geschüttelt. Die Probe wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 50:49:1) vorsichtig gemischt und 10 min bei 3000 g zentrifugiert. Die organische Phase wurde verworfen und die wässrige Phase wieder mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform überschichtet, gemischt und zentrifugiert. Es wurde wiederum die organische Phase verworfen und die wässrige Phase mit Chloroform (Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 49:1) gemischt und zentrifugiert. Die organische Phase wurde vollständig abgenommen und die wässrige Phase sehr vorsichtig mit dem 2,5-fachen Volumen eiskaltem Ethanol überschichtet. Mit einer Pasteurpipette, deren Ende zu einem Haken geschmolzen wurde, wurde an der Interphase die ausgefallene DNA vorsichtig aufgedreht. Die am Haken haftende DNA wurde nacheinander in eiskaltem Ethanol, Ethylether und nochmals in eiskaltem Ethanol gewaschen und an der Luft etwa 30 min getrocknet. Um die DNA zu lösen wurde der Haken mehrere Stunden in 500 µl H<sub>2</sub>O gestellt.

### 1.3.9 RT-PCR

Axenisch gewachsene *Dictyostelium discoideum*-Zellen wurden bei 800 g pelletiert, mit eiskaltem SPB gewaschen und die Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit gemäß den Protokollen des Herstellers für tierische Zellen isoliert. Die erhaltene RNA wurde für 60 min bei 37 °C einem

Verdau mit DNase I (RNase-frei) unterzogen und anschließend erneut mit dem RNeasy Mini Kit aufgereinigt. Die Konzentration und Reinheit wurde UV-spektroskopisch ermittelt und die Proben sofort verwendet bzw. bei -20 °C gelagert.

Je 1 µg RNA wurde in einer einstufigen RT-PCR-Reaktion eingesetzt. Mit Hilfe des Access RT-PCR Systems und je 50 pmol des jeweiligen Primerpaares wurde die cDNA in einem Thermocycler gemäß dem Protokoll des Herstellers synthetisiert und amplifiziert (siehe auch 5.3.4). Durch Agarose-Gelelektrophorese wurde überprüft, dass nur ein Produkt synthetisiert wurde und das Expressionsniveau verglichen. Zur Kontrolle dienten dabei Transkripte der konstitutiv exprimierten Proteine Aktin und GAPDH.

## **1.4 Proteinchemische Methoden**

### **1.4.1 Herstellung von Lysaten aus *D. discoideum*-Zellen**

Axenisch gewachsene Zellen wurden einem Osmoschock unterzogen (siehe 5.2.9) und nach 2 h abzentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal in eiskaltem SPB/400 mM Sorbit/Complete Protease Inhibitor Cocktail gewaschen und das Pellet durch wiederholtes Schockfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen lysiert. Die Proben wurde bei -20 °C gelagert. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, denen SPB statt Sorbitlösung zugesetzt wurde. Diese Zellen wurden entsprechend in SPB/Complete Protease Inhibitor Cocktail gewaschen und lysiert.

### **1.4.2 Isolierung der Cytoskelettfraktion und der cytosolischen Fraktion aus *D. discoideum*-Zellen**

Axenisch gewachsene Zellen wurden wie unter 5.2.9 beschrieben hyperosmotisch geschockt, nach 2 h abzentrifugiert, in Natriumphosphat-Puffer/400 mM Sorbit gewaschen und mit



Natriumphosphat-Puffer/400 mM Sorbit auf  $1 \cdot 10^8$  Zellen/ml eingestellt. Es wurde das gleiche Volumen 2x CSK-Puffer zugegeben und die Suspension zuerst 10 min auf Eis und danach 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Das Lysat wurde 10 min bei 11000 g zentrifugiert und das Pellet als Cytoskelettfraktion in 100 µl Natriumphosphat-Puffer/Complete Protease Inhibitor Cocktail resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, denen SPB statt Sorbitlösung zugesetzt wurde. Diese Zellen wurden in Natriumphosphat-Puffer gewaschen und resuspendiert.

#### 1.4.3 Isolierung der Membranfraktion aus *D. discoideum*-Zellen

Axenisch gewachsene Zellen wurden in Flüssigkultur hyperosmotisch geschockt, nach 2 h abzentrifugiert und mit Saccharose-Lysepuffer auf  $1-2 \cdot 10^8$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Schockfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen lysiert. Das Lysat wurde bei 38000 g und 4 °C in einem SS34-Rotor für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Saccharose-Lysepuffer resuspendiert, wiederum abzentrifugiert und in 2 ml Natriumphosphat-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde auf einen Stufengradienten, bestehend aus 2,5 ml 55 % w/v Saccharose in Natriumphosphat-Puffer und 8 ml 35 % w/v Saccharose in Natriumphosphat-Puffer, aufgetragen. Die nachfolgende Ultrazentrifugation wurde ÜN in einem TST41-Schwing rotor bei 150.000 g und 4 °C durchgeführt. Die graue Interphase wurde großzügig abgenommen und in 8 ml Natriumphosphat-Puffer resuspendiert und zweimal bei 27000 g und 4 °C für 10 min gewaschen. Die Membranfraktion wurde in 100-200 µl Natriumphosphat-Puffer/Complete Protease Inhibitor Cocktail resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

#### 1.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Gießen der Gele (0,75 mm oder 1,5 mm Schichtdicke) wurde in einer SDS-Gel-Gießkammer (Mighty Small Multiple Gel Caster) durchgeführt. Nach dem Gießen des Trenngels wurde die Flüssigkeit mit Isopropanol überschichtet, um eine gleichförmige Oberfläche zu erhalten. Nach 1 h wurde das Isopropanol abgegossen, das Trenngel mit Sammelgel-Lösung überschichtet und die Kämme für die späteren Probestaschen eingesetzt. Zur Herstellung der Gele wurde eine Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglösung (Protogel) verwendet.

Die Durchführung der SDS-Gelelektrophorese erfolgte in einer SE 250 Mighty Small II Laufkammer, in die die gegossenen Gele eingesetzt wurden. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen Laemmli-Puffer gemischt und 5 min gekocht. Proben, die bereits stärker verdünnt waren, wurden mit 1/3 Volumen Roti-Load gemischt. Bei der Auftrennung von Membranproben wurden die Proben 2 h bei 60 °C inkubiert. Die Kammer wurde mit SDS-Laufpuffer gefüllt und die Elektrophorese bei 100-150 V, bei höheren Spannungen mit Wasserkühlung, durchgeführt.

#### 1.4.5 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen erfolgte in Coomassie-Färbelösung für Gele, in der das Gel mindestens 30 min oder ÜN geschüttelt wurde. Danach wurde das Gel mehrmals in Entfärbelösung gewaschen, um es zu entfärben.

Um die Färbelösung herzustellen, wurde Coomassie Brilliantblau R-250 ÜN in Ethanol gelöst, bevor Eisessig und Wasser zugegeben wurden.

#### 1.4.6 Silberfärbung

Um eine Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen durchzuführen, wurden die Gele 30 min in Fixierlösung und anschließend mindestens 2 h in frisch hergestellter Inkubationslösung

geschüttelt. Die Gele wurden danach dreimal 5 min in H<sub>2</sub>O gewaschen und 45 min in Silberfärbelösung inkubiert. Die Gele wurden anschließend kurz in H<sub>2</sub>O geschwenkt und Entwickler zugegeben. Sobald der gewünschte Grad der Färbung erreicht war, wurden die Gele in Stopplösung überführt.

#### 1.4.7 Gel Trocknung

Zur Konservierung wurden die Gele, gegebenenfalls nach Fixierung der Proteine, für 1 h in H<sub>2</sub>O, das mehrmals gewechselt wurde, gewaschen und zwischen zwei ebenfalls in H<sub>2</sub>O getränkten Cellophanfolien auf den Vakuum-Geltrockner gelegt. Nachdem etwaige Luftblasen entfernt waren, wurde Vakuum angelegt und die Gele bei 80 °C etwa 90 min getrocknet.

Alternativ wurden die Gele für 30-60 min in Konservierungslösung inkubiert, bevor sie zwischen zwei ebenfalls in Konservierungslösung getränkten Cellophanfolien in einen Plexiglasrahmen gespannt wurden und mind. ÜN bei Zimmertemperatur hängend trockneten.

#### 1.4.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

##### Bradford-Test (Bradford, 1976)

Der Test beruht auf der Tatsache, daß sich durch Bindung von Coomassie Brilliantblau G-250 an Proteine das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Da Detergenzien den Nachweis beeinflussen, wurden nur Proben, in den keine Detergenzien enthalten waren, mit diesem Test untersucht.

Herstellung der Bradford-Lösung:

0,1 g Coomassie Brilliantblau G-250 wurden in 50 ml Ethanol ÜN gelöst, mit 100 ml 85 %iger Phosphorsäure gemischt und mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung wurde filtriert und lichtgeschützt gelagert.

**Durchführung:**

Pro Ansatz wurden 990 µl Bradford-Lösung mit 10 µl Probe gemischt und 3 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Als Nullprobe wurden 990 µl Bradford-Lösung mit 10 µl H<sub>2</sub>O eingesetzt. Es wurde jeweils die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur Eichung der Messwerte wurden BSA-Lösungen eingesetzt, die zwischen 0,04 und 1 mg/ml BSA enthielten.

**BCA-Methode**

Dieser Test beruht auf der Reduktion von Cu<sup>2+</sup>-Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung. Die entstehenden Cu<sup>+</sup>-Ionen bilden mit Bicinchonininsäure einen violetten Komplex. Da andere Reduktionsmittel interferieren, wurden mit dieser Methode nur Proben gemessen, die deutlich weniger als 1 mM DTT oder vergleichbarer Reduktionsmittel (2-Mercaptoethanol, Glutathion) enthielten.

**Durchführung:**

Es wurde der BCA Protein Assay verwendet. 980 µl Lösung A wurden mit 20 µl Lösung B und 100 µl Probe gemischt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Als Nullprobe wurde 100 µl Puffer mit dem Mix von Lösung A und B inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 562 nm bestimmt. Zur Eichung wurden je 100 µl von BSA-Lösungen eingesetzt, die 0,04-1 mg/ml BSA enthielten.

**1.4.9 Semi-trockener Western-Transfer (Western Blot)**

Sechs Whatman-Filterpapierstücke und eine PVDF-Membran wurden auf 4,5 x 8,8 cm zugeschnitten. Die Membran wurde durch Waschen in Methanol benetzt und in Western-Transferpuffer 10 min inkubiert. Sollten Proteine >100 kD augetrennt werden, enthielt der Transferpuffer kein Methanol. Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der SDS-PAGE 15-20 min in Transferpuffer umgepuffert, die Filterpapierstücke ebenfalls kurz darin eingeweicht. Der Transfer erfolgte in einem „Trans-Blot SD semi-dry transfer system“ (Biorad, München). Dabei

wurden nacheinander drei Whatman-Filter, die Membran, das Gel und wiederum drei Whatman-Filter blasenfrei übereinandergelegt. Das Blotting wurde 30–45 min bei 15–18 V durchgeführt und die Membran danach getrocknet. Die Transfereffizienz wurde durch Coomassie-Färbung des Geles bzw. anhand eines bei der SDS-PAGE mitaufgetragenen vorgefärbten Proteinstandards kontrolliert.

#### 1.4.10 Immunfärbung

Nach dem semi-trockenen Western-Transfer wurde die getrocknete PVDF-Membran mit Methanol benetzt und zweimal 5 min in TBS/0,05 % v/v Tween-20 (TBS-T) gewaschen. Anschließend wurde der Blot 2 h oder ÜN in TBS-T/5 % w/v BSA geschüttelt. Die Membran wurde anschließend viermal mit TBS-T gewaschen und mindestens 2 h mit dem ersten Antikörper inkubiert. Gereinigter Antikörper wurde in Konzentrationen zwischen 1:200 und 1:2000 in TBS-T verdünnt eingesetzt. Wurde Kulturüberstand von Hybridomazellen verwendet, wurde dieser 1:1 in TBS-T verdünnt eingesetzt. Die Membran wurde anschließend viermal in TBS-T gewaschen und mit einer Lösung des zweiten Antikörpers, 1:2000 bis 1:20000 in TBS-T verdünnt, für 1 h inkubiert. Die Membran wurde wiederum viermal mit TBS-T gewaschen und 60 s in einem frisch angesetzten Mix aus je 2 ml der beiden Lösungen des „Renaissance Chemiluminescence Reagent“ geschüttelt. Die an der Membran haftende Flüssigkeit wurde abgetropft und die Membran in eine Frischhaltefolie gewickelt. Die Lumineszenz wurde sofort durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert, da die Reaktion nach etwa 30 min abklingt.

#### 1.4.11 Coomassie-Färbung von PVDF-Membranen

Die Färbung von PVDF-Membranen erfolgte in einer Coomassie-Färbelösung für Western Blots, in der die Membran 1-2 min geschwenkt wurde. Danach wurde die Membran mehrmals in Entfärbelösung gewaschen und anschließend getrocknet.

Um die Färbelösung herzustellen, wurde zuerst Coomassie Brilliantblau R-250 ÜN in Methanol gelöst, bevor Essigsäure und Wasser zugegeben wurden.

#### 1.4.12 Reinigung von monoklonalen Antikörpern

Antikörper-produzierende Hybridomazellen wurden aus einem -196 °C-Tank aufgetaut und in Gewebekulturflaschen 156502 mit RPMI 1640 Medium inkubiert, dem Penicillin/Streptomycin und 7,5 % v/v fötales Kälberserum zugegeben wurde. Bei neuen Chargen an fötalem Kälberserum wurde in Vorversuchen getestet, ob die Zellen mit der neuen Charge wachsen und Antikörper produzieren. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert bis der Boden der Gewebekulturflasche dicht bedeckt war. Der Überstand, der die Antikörper enthielt, wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Um weiteren Kulturüberstand zu produzieren wurden die Zellen leicht abgeklopft und mit einer Pipette abgenommen. Danach wurden neues Medium zugegeben und wiederum inkubiert, bis ein dichter Zellrasen entstand. Dieser Zyklus konnte mehrmals wiederholt werden.

Um monoklonalen Antikörper aus den Kulturüberständen von Hybridomazellen zu isolieren, wurde die Suspension bei 6000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. 55 Volumenanteile einer gesättigten und frisch filtrierten Ammoniumsulfat-Lösung wurden hierfür allmählich unter ständigem Rühren zu 45 Volumenanteilen Kulturüberstand gegeben und ÜN im Kühlraum weitergerührt. Das Präzipitat wurde bei 8000 g wie oben abzentrifugiert und in 50-100 ml Dialysepuffer resuspendiert. Die Suspension wurde ÜN gegen 3 l Dialysepuffer dialysiert und wiederum zentrifugiert. Durch

Zugabe von festem NaCl wurde der Überstand unter Rühren auf 3 M NaCl gebracht. In der Zwischenzeit wurde 0,3-0,8 g Protein A-Sepharose CL-4B in 20 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert, in eine XK-16-Säule gefüllt und die Säule an eine FPLC mit UV-Detektor angeschlossen. Die Äquilibration wurde mit 20 ml Waschpuffer bei einer Flussrate von 5 ml/h durchgeführt. Zum Auftragen ließ man die Antikörperlösung ÜN bei 2 ml/h über die Säule zirkulieren. Danach wurde die Säule erneut mit 100 ml Waschpuffer gespült. Die Elution erfolgte mit 40 ml Elutionspuffer, wobei das Eluat in 0,5 ml Fraktionen aufgefangen wurde, die durch Vorlage von 100 µl 2 M Tris/HCl, pH 9,0 sofort neutralisiert wurden. Die Proben des Hauptsignals, durch Absorption bei 280 nm detektiert, wurden mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit untersucht (zwei charakteristische Banden bei 25-30 bzw. 50 kD, die über 95 % des Gesamtproteins entsprechen sollten), gepoolt und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Lag diese unter 1 mg/ml wurde die Probe durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Dazu wurde die Antikörperlösung in Centricon-10- bzw. Centriprep-10-Konzentratoren durch Zentrifugation bei 2000 g und 4 °C auf 2-3 mg/ml aufkonzentriert. Die Proben wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Aufgetaute Proben wurden nicht wieder eingefroren und nach Zugabe von 0,02 % w/v NaN<sub>3</sub> bei 4 °C gelagert.

#### 1.4.13 Reinigung von GST-RdeA

Für die heterologe Expression von GST-RdeA wurden der *E.coli*-Stamm PT15 über Nacht bei 37 °C und 250 Upm in LB-Medium mit Ampicillin angezogen und 2 - 3 l TB-Medium (mit reduzierter Antibiotika-Konzentration) 1:50 inokuliert. Die bei 37 °C und 150 Upm wachsenden Zellen wurden bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,7 durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und nach 4 h abzentrifugiert (bei 4 °C, 7000 g, 4 min). Die Zellen wurden in eiskaltem Resuspensionspuffer (1/100 des Kulturvolumens) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis durch Ultraschall (dreimal 60 s) lysiert und nach weiteren 20 min bei 39000 g klarzentrifugiert. Der Überstand, der den Großteil des RdeA enthielt, wurde ÜN über eine

selbstgepackte Glutathion-Sepharose-Säule (ca. 1 ml Glutathion-Sepharose/ 1 Kultur) zirkulieren lassen. Nach 1-2stündigem Waschen mit Waschpuffer wurde das an die Matrix gebundene Protein mit 10 mM Glutathion in Waschpuffer eluiert. Bei entsprechender Reinheit wurde das gewonnene Protein direkt für Phosphorylierungsexperimente verwendet, falls die Verunreinigungen noch mehr als 25 % des Gesamtproteins umfassten, wurde das Protein über eine vorgepackte 1 ml-“Ressource Q”-Anionenaustauschersäule weiter gereinigt.

#### 1.4.14 Reinigung von GST-RR bzw. GST-RRDA

Zur heterologen Expression von GST-RR und GST-RRDA wurden die *E.coli*-Stämme AO24-28 bzw. AO25-9 über Nacht bei 37 °C und 250 Upm in LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol angezogen und 3 l TB-Medium (mit reduzierter Antibiotika-Konzentration) 1:50 inokuliert. Die bei 24 °C und 150 Upm wachsenden Zellen wurden bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,7 durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) induziert und nach 2 h abzentrifugiert (bei 4 °C, 7000 g, 4 min). Der Aufschluss der Zellen und die Reinigung des jeweiligen GST-Fusionsproteins erfolgte analog der unter 5.4.13 beschriebenen Methode. Das gewonnene Protein wurde bei 4 °C maximal 48 h gelagert.

#### 1.4.15 Autoradiographie

Für die Autoradiographie wurde ein Kodak X-OMAT AR-5 Film auf den trockenen Blot bzw. das getrocknete Gel aufgelegt und in einer Filmkassette 1-4 Tage bei -70°C gelagert. Anschließend wurde der Röntgenfilm am Kodak M35 Prozessor entwickelt.



#### 1.4.16 *In vitro*-<sup>32</sup>P-Isotopenmarkierung

Die Phosphorylierung von GST-RdeA mit der katalytischen Domäne von CheA wurde bei 25 °C in Phosphorylierungspuffer mit 40 µCi [ -<sup>32</sup>P]ATP in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Die Konzentration beider Proteine betrug 5 µM, die Konzentration des zugegebenen GST-RR bzw. GST-RRDA, das frisch gereinigt wurde, betrug 1 µM in 50 mM Tris/HCl, pH 8.3. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurde die Reaktion durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff beendet, die Proteine anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach der Analyse der <sup>32</sup>P-Markierung mittels Autoradiographie (siehe 5.4.15) wurde die Lage der Proteinbanden durch Färbung mit Coomassie R-250 ermittelt.

#### 1.1.17 Dephosphorylierung von RdeA

GST-RdeA wurde wie unter 5.4.16 beschrieben in einem Volumen von 200 µl phosphoryliert. Nach einer Reaktionszeit von 1 h wurden die freien Nukleotide durch Gelfiltration über G-50-Säulen und Mikrodialyse gegen 30 ml des [ -<sup>32</sup>P]ATP-freien Phosphorylierungspuffers für 20 min abgetrennt. Zu 30 µl-Aliquots der dialysierten Proteinlösung wurden je 10 µl einer 4 µM GST-RR- bzw. GST-RRDA-Lösung (das Protein sollte nicht mehr als 2 d bei 4 °C gelagert worden sein) in 50 mM Tris/HCl, pH 8.3 gegeben und die Reaktion zum angegebenen Zeitpunkt durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff beendet. Die Analyse erfolgte wie unter 5.4.16 beschrieben.

### 1.5 Bestimmung der Phosphodiesterase-Aktivität

Axenisch gewachsene *Dictyostelium*-Zellen wurden nach zweimaligem Waschen in eiskaltem SPB für 3 h bei Zimmertemperatur, 150 Upm und einer Dichte von  $3 \times 10^7$  Zellen/ml geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend bei 800 g abzentrifugiert und in PDE-Reaktionspuffer

resuspendiert, wobei eine Dichte von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt wurde. Die Zellen wurden durch Sonifizieren (mit einer Microtip 3x 30 s gepulst mit jeweils 60 s Pause) auf Eis lysiert, die Suspension anschließend 3 min bei 10000 g zentrifugiert und 1,92 ml des Überstands mit 80 µl 0,5 M DTT und 8 µl DMSO versetzt. Bei Kontrollexperimenten wurde 100 mM IBMX in DMSO verwendet. Nach 20 min wurde 2 nmol cAMP (als 100 µM Lösung in H<sub>2</sub>O) zugegeben und die Lösung kurz geschüttelt. 10 s nach der cAMP-Zugabe wurde eine erste Probe von 150 µl mit 200 µl Methanol/Chloroform (3:1) versetzt, um die Reaktion zu beenden, und auf Eis gestellt. Innerhalb einer Gesamtreaktionszeit von 20 min bei Zimmertemperatur wurden regelmäßig weitere Proben entnommen und ebenso behandelt. Im Anschluss wurden die Proben bei 4 °C und 10000 g zentrifugiert und je 2 Aliquots à 50 µl der wässrigen Phase entnommen, um sie auf ihren cAMP-Gehalt zu untersuchen (siehe 5.2.12). Die Ergebnisse wurden auf den Proteingehalt der Lysate normiert, die Bestimmung erfolgte nach der BCA-Methode aus dem Überstand der Zentrifugation nach dem Sonifizieren.

## 6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACA	Adenylatcyclase A aus <i>D. discoideum</i>
ACG	Adenylatcyclase G aus <i>D. discoideum</i>
Amp	Ampicillin
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
AMV-RT	Reverse Transkriptase aus AMV
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches 3':5'-Adenosinmonophosphat
cAR	cAMP-Rezeptor
cGMP	zyklisches 3':5'-Guanosinmonophosphat
Ci	Curie
cpm	Counts pro Minute
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DokA	Dictyostelium osmosensing kinase A

DTT	Dithiothreitol
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
fl	Femtoliter, $10^{-15}$ Liter
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
<i>g</i>	relative Zentrifugalkraft
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gl.	Gleichung
G-Protein	Guanosintriphosphat bindendes Protein
h	Stunde
Hepes	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
inkl.	inklusive
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IU	international unit
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
m	milli-, $10^{-3}$
$\mu$	mikro-, $10^{-6}$
mAb	monoklonaler Antikörper
min	Minute
M	Mol pro Liter
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKKK	MAPKK-Kinase-Kinase

mOsm	Milliosmol pro Kilogramm
n	nano-, $10^{-9}$
Nonidet P40	Ethylphenylpoly(ethylenglycolether) <sub>n</sub>
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
p	pico-, $10^{-12}$
pAb	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
P <sub>i</sub>	Orthophosphat, anorganisches Phosphat
PKA	Proteinkinase A, cAMP-abhängige Proteinkinase
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rde	rapid development
RR	Regulator (engl. response regulator)
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	kombinierte Reverse-Transkriptase-Reaktion und Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TB-Medium	“terrific broth”-Medium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin

---

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Triton X-100; X-114	Octylphenolpoly(ethylenglycolether) <sub>n</sub>
Tween	Polyoxyethylenglykol-sorbitolester-monolaureat
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute

## 7 Literaturverzeichnis

- Abe, H., Uchimaya, M., Tanaka, Y. und Saito, H. 1976. Structure of discadenine, a spore germination inhibitor from cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. *Tetrahedron Lett.* **42**:3807-3810.
- Abe, K. und Yanagisawa, K. 1983. A new class of rapidly developing mutants in *Dictyostelium discoideum*: implications for cyclic AMP metabolism and cell differentiation. *Dev. Biol.* **95**:200-209.
- Adam, G., Luger, P. und Stark, G. 1988. Physikalische Chemie und Biophysik. Springer-Verlag, Berlin.
- Aizawa, H., Katadae, M., Maruya, M., Sameshima, M., Murakami-Murofushi, K. und Yahara, I. 1999. Hyperosmotic stress-induced reorganization of actin bundles in *Dictyostelium* cells over-expressing cofilin. *Genes Cells.* **4**:311-324.
- Alex, L.A., Borkovich, K.A. und Simon, M.I. 1996. Hyphal development in *Neurospora crassa*: Involvement of a two-component histidine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:3416-3421.
- Alex, L.A., Korch, C., Selitrennikoff, C. und Simon, M.I. 1998. *COSI*, a two-component histidine kinase that is involved in hyphal development in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:7069-7073.
- Appleby, J.L., Parkinson, J.S. und Bourret, R.B. 1996. Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell.* **86**:845-848.
- Aubry, L. und Firtel, R. 1999. Integration of signaling networks that regulate *Dictyostelium* differentiation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**:469-517.

- Baumgarten, C.M. und Feher, J.J. 1995. Osmosis and the regulation of cell volume, S. 180-211. In: Cell Physiology: Source Book. Sperelakis, N. (Hrsg.). Academic Press, San Diego, CA.
- Blomberg, A. und Adler, L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microbial Physiol.* **33**:145-212.
- Bonner, J.T. 1947. Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Exp. Zool.* **106**:1-26.
- Botsford, J.L. und Harman, J.G. 1992. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **56**:100-122.
- Bozzaro, S. 1992. *Dictyostelium*: From unicellularity to multicellularity, S. 137-149. In: Development. The molecular genetic approach. Russo, V.E.A., Brody, S., Cove, D. und Ottolenghi, S. (Hrsg.). Springer Verlag, Berlin.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Bretschneider, T., Siegert, F. und Weijer, C.J. 1995. Three-dimensional scroll waves of cAMP could direct cell movement and gene expression in *Dictyostelium* slugs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **92**:4387-4391.
- Brindle, P.K. und Montminy, M.R. 1992. The CREB family of transcription activators. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **2**:199-204.
- Brown, J.M., Briscoe, C. und Firtel, R.A. 1997. Control of transcriptional regulation by signal transduction pathways in *Dictyostelium* during multicellular development, S. 245-265. In: *Dictyostelium - A Model System for Cell and Developmental Biology*. Maeda, Y., Inouye, K., Takeuchi, I. (Hrsg.). Universal Academy Press, Tokyo.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. 1987. A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques.* **5**:376-380.
- Burbulys, D., Trach, K.A. und Hoch, J.A. 1991. The initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell.* **64**:545-552.



- Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B. und Meyerowitz, E.M. 1993. *Arabidopsis* ethylene-response gene *etr1*: similarity of product to two-component regulators. *Science*. **262**:539-544.
- Chang, W.T., Thomason, P.A., Gross, J.D. und Newell, P.C. 1998. Evidence that the RdeA protein is a component of a multistep phosphorelay modulating rate of development in *Dictyostelium*. *EMBO J.* **17**:2809-2816.
- Chia, C.P., Shariff, A., Savage, S.A. und Luna, E.J. 1993. The integral membrane protein, ponticulin, acts as a monomer in nucleating actin assembly. *J. Cell Biol.* **120**:909-922.
- Cohen, P. 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **58**:453-508.
- Cook, S.J. und McCormick, F. 1993. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science*. **262**:1069-1072.
- Corpet, F., Gouzy, J. und Kahn, D. 1999. Recent improvements of the ProDom database of protein domain families. *Nucleic Acids Res.* **27**:263-267.
- Cotter, D.A. 1977. The effects of osmotic pressure changes on the germination of *Dictyostelium* discoideum spores. *Can. J. Microbiol.* **23**:1170-1177.
- Cotter, D.A. 1981, S. 385-411. In: The Fungal Spore: Morphogenetic Controls. Turian, G. und Hohl, H.R. (Hrsg.). Academic Press, New York.
- Cotter, D.A., Dunbar, A.J., Buconjic, S.D. und Wheldrake, J.F. 1999. Ammonium phosphate in sori of *Dictyostelium discoideum* promotes spore dormancy through stimulation of the osmosensor ACG. *Microbiology*. **145**:1891-1901.
- Darmon, M. und Klein, C. 1978. Effects of amino acids and glucose on adenylate cyclase and cell differentiation of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* **63**:377-389.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J.T., Verheijen, M.H.G., Cool, R.H., Nijman, S.M.B., Wittinghofer, A. und Bos, J.L. 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*. **396**:474-477.

- Dunbar, A.J. und Wheldrake, J.F. 1997. Ammonia metabolism during the development of *Dictyostelium discoideum* and the role of glutamine synthetase, S. 337-348. In: *Dictyostelium - A Model System for Cell and Developmental Biology*. Maeda, Y., Inouye, K., Takeuchi, I. (Hrsg.). Universal Academy Press, Tokyo.
- Edmonds, B.T., Bell, A., Wyckoff, J., Condeelis, J. und Leyh, T.S. 1998. The effect of F-actin on the binding and hydrolysis of guanine nucleotide by *Dictyostelium* elongation factor 1A. *J. Biol. Chem.* **273**:10288-10295.
- England, P.J. 1976. Studies on the phosphorylation of the inhibitory subunit of troponin during modification of contraction in perfused rat heart. *Biochem. J.* **160**:295-304.
- Faix, J., Gerisch, G. und Noegel, A.A. 1992. Overexpression of the csA cell adhesion molecule under its own cAMP-regulated promoter impairs morphogenesis in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **102**:203-214.
- Firtel, R.A. 1995. Integration of signaling information in controlling cell-fate decisions in *Dictyostelium*. *Gen. Dev.* **9**:1427-1444.
- Francis, S.H. und Corbin, J.D. 1994. Progress in understanding the mechanism and function of cyclic GMP-dependent protein kinase. *Adv. Pharmacol.* **26**:115-170.
- Gamble, R.L., Coonfield, M.L. und Schaller, G.E. 1998. Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **95**:7825-7829.
- Gerisch, G. 1976. Extracellular cyclic AMP phosphodiesterase regulation in agar plate cultures of *Dictyostelium discoideum*. *Cell Differentiation.* **5**:21-25.
- Ginsburg, G.T., Gollop, R., Yu, Y., Louis, J.M., Saxe, C.L. und Kimmel, A.R. 1995. The regulation of *Dictyostelium* development by transmembrane signalling. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**:200-205.
- Goodloe-Holland, C.M. und Luna, E.J. 1987. Purification and characterization of *Dictyostelium discoideum* plasma membranes. *Methods in Cell Biology.* **28**:103-128.

- Green, A.A. und Newell, P.C. 1975. Evidence for the existence of two types of cAMP binding sites in aggregating cells of *Dictyostelium discoideum*. *Cell*. **6**:129-136.
- Grimaldi, M., Favit, A. und Alkon, D.L. 1999. cAMP-induced cytoskeleton rearrangement increases calcium transients through the enhancement of capacitative calcium entry. *J. Biol. Chem.* **274**:33557-33564.
- Henderson, E. 1975. *J. Biol. Chem.* **250**:4730-4735.
- Herskowitz, I. 1995. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell*. **80**:187-197.
- Hoch, J.A. 1995. Control of cellular development in sporulating bacteria by the phosphorelay two-component signal transduction system, S. 129-144. *In: Two-Component Signal Transduction*. Hoch, J.A. und Silhavy, T.J. (Hrsg.). ASM press, Washington, DC.
- Hoch, J.A. und Silhavy, T.J. 1995. Two-component signal transduction. ASM Press, Washington, D.C.
- Hopper, N.A., Sanders, G.M., Fosnaugh, K.L., Williams, J.G. und Loomis, W.F. 1995. Protein kinase A is a positive regulator of spore coat gene transcription in *Dictyostelium*. *Differentiation*. **58**:183-188.
- Houslay, M.D. und Milligan, G. 1997. Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem. Sci.* **22**:217-224.
- Huggins, J.P. und England, P.J. 1983. Sarcolemmal phospholamban is phosphorylated in isolated rat hearts perfused with isoprenaline. *FEBS L.* **163**:297-302.
- Insall, R.H. 1996. Cyclic GMP and the big squeeze. *Curr. Biol.* **6**:516-518.
- Insall, R.H., Soede, R.D., Schaap, P. und Devreotes, P.N. 1994. Two cAMP receptors activate common signaling pathways in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell*. **5**:703-711.
- Jin, T., Amzel, M., Devreotes, P.N. und Wu, L. 1998. Selection of  $\alpha$  subunits with point mutations that fail to activate specific signaling pathways in vivo: dissecting cellular responses mediated by a heterotrimeric G protein in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell*. **9**:2949-2961.

- Johnson, R.L., van Haastert, P.J., Kimmel, A.R., Saxe, C.L.d., Jastorff, B. und Devreotes, P.N. 1992. The cyclic nucleotide specificity of three cAMP receptors in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* **267**:4600-4607.
- Johnson, R.L., Vaughan, R.A., Caterina, M.J., van Haastert, P.J. und Devreotes, P.N. 1991. Overexpression of the cAMP receptor 1 in growing *Dictyostelium* cells. *Biochemistry.* **30**:6982-6986.
- Kakimoto, T. 1996. CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science.* **274**:982-985.
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E. und Graybiel, A.M. 1998. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science.* **282**:2275-2279.
- Kessin, R.H. 1977. Mutations causing rapid development of *Dictyostelium discoideum*. *Cell.* **10**:703-708.
- Kim, H.J., Chang, W.T., Meima, M., Gross, J.D. und Schaap, P. 1998. A novel adenylyl cyclase detected in rapidly developing mutants of *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* **273**:30859-30862.
- Kishi, Y., Clements, C., Mahadeo, D.C., Cotter, D.A. und Sameshima, M. 1998. High levels of actin tyrosine phosphorylation: correlation with the dormant state of *Dictyostelium* spores. *J. Cell Sci.* **111**:2923-2932.
- Klein, C., Brachet, P. und Darmon, M. 1977. Periodic changes in adenylate cyclase and cAMP receptors in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS L.* **76**:145-147.
- Klein, G. und Satre, M. 1986. Kinetics of the fluid-phase pinocytosis in *Dictyostelium discoideum* amoebae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**:1146-1152.
- Konijn, T.M., van de Meene, J.G., Bonner, J.T. und Barkley, D.S. 1967. The acrasin activity of adenosine-3',5'-cyclic phosphate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **58**:1152-1154.
- Krauss, G. 1997. Biochemie der Regulation und Signaltransduktion - das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biochemiker, Biologen und Mediziner. Wiley-VCH, Weinheim.

- Krebs, E.G. 1989. The Albert Lasker Medical Awards. Role of the cyclic AMP-dependent protein kinase in signal transduction. *JAMA*. **262**:1815-1818.
- Kuwayama, H., Ecke, M., Gerisch, G. und van Haastert, P.J. 1996. Protection against osmotic stress by cGMP-mediated myosin phosphorylation. *Science*. **271**:207-209.
- Kuwayama, H. und van Haastert, P.J.M. 1998. Chemotactic and osmotic signals share a cGMP transduction pathway in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett*. **424**:248-252.
- Kwon, H.M. und Handler, J.S. 1995. Cell volume regulated transporters of compatible osmolytes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:465-471.
- Li, S., Ault, A., Malone, C.L., Raitt, D., Dean, S., Johnston, L.H., Deschenes, R.J. und Fassler, J.S. 1998. The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J.* **17**:6952-6962.
- Liu, G., Edmonds, B.T. und Condeelis, J. 1996. pH, EF-1-alpha and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **6**:168-171.
- Loomis, W.F. 1998. Role of PKA in the timing of developmental events in *Dictyostelium* cells. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:684-694.
- MacKenzie, S.J., Baillie, G.S., McPhee, I., Bolger, G.B. und Houslay, M.D. 2000. ERK2 mitogen-activated protein kinase binding, phosphorylation, and regulation of the PDE4D cAMP-specific phosphodiesterases - The involvement of COOH-terminal docking sites and NH2-terminal UCR regions. *J. Biol. Chem.* **275**:16609-16617.
- Maeda, T., Takekawa, M. und Saito, H. 1995. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*. **269**:554-558.
- Malchow, D., Nagele, B., Schwarz, H. und Gerisch, G. 1972. Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* **28**:136-142.

- Matsubara, M., Kitaoka, S., Takeda, S. und Mizuno, T. 2000. Tuning of the porin expression under anaerobic growth conditions by His-to-Asp cross-phosphorelay through both the EnvZ-osmosensor and ArcB-anaerosensor in *Escherichia coli*. *Genes Cells*. **5**:555-569.
- Matsubara, M. und Mizuno, T. 2000. The SixA phospho-histidine phosphatase modulates the ArcB phosphorelay signal transduction in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. **470**:118-124.
- McConnell, B.K., Moravec, C.S., Morano, I. und Bond, M. 1997. Troponin I phosphorylation in spontaneously hypertensive rat heart: effect of beta-adrenergic stimulation. *Amer. J. Physiol.* **273**:H1440-1451.
- Meima, M.E. und Schaap, P. 1999. Fingerprinting of adenylyl cyclase activities during *Dictyostelium* development indicates a dominant role for adenylyl cyclase B in terminal differentiation. *Dev. Biol.* **212**:182-190.
- Mischak, H., Seitz, T., Janosch, P., Eulitz, M., Steen, H., Schellerer, M., Philipp, A. und Kolch, W. 1996. Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621. *Mol. Cell. Biol.* **16**:5409-5418.
- Mooibroek, M.J. und Wang, J.H. 1988. Integration of signal-transduction processes. *Biochem. Cell Biol.* **66**:557-566.
- Nanjundiah, V. 1997. Models for pattern formation in the Dictyostelid slime molds, S. 305-322. In: *Dictyostelium - A Model System for Cell and Developmental Biology*. Maeda, Y., Inouye, K., Takeuchi, I. (Hrsg.). Universal Academy Press, Tokyo.
- Oehme, F. 1999. Untersuchungen zur Funktion von DokA in der Osmoregulation von *Dictyostelium discoideum*. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Ohlsen, K.L., Grimsley, J.K. und Hoch, J.A. 1994. Deactivation of the sporulation transcription factor Spo0A by the Spo0E protein phosphatase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **91**:1756-1760.
- Ota, I.M. und Varshavsky, A. 1993. A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science*. **262**:566-569.

- Oyama, M. und Kubota, K. 1997. H<sup>+</sup> secretion induced by hypertonic stress in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Biochem.* **122**:64-70.
- Parkinson, J.S. 1993. Signal transduction schemes of bacteria. *Cell.* **73**:857-871.
- Parkinson, J.S. und Kofoed, E.C. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Gen.* **26**:71-112.
- Perego, M. 1997. A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **94**:8612-8617.
- Perego, M., Hanstein, C., Welsh, K.M., Djavakhishvili, T., Glaser, P., and Hoch, J.A. 1994. Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell.* **97**:1047-1055.
- Pintsch, T. 2000. Physiologische Antworten auf hyperosmotischen Stress in *Dictyostelium discoideum*. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Pintsch, T., Satre, M., Klein, G., Martin, J.-B. und Schuster, S.C. eingereicht.
- Pintsch, T. und Schuster, S.C. 2000. Hyperosmolarity: stress or signal? *BIOforum Int.* **4**:25-26.
- Pitt, G.S., Milona, N., Borleis, J., Lin, K.C., Reed, R.R. und Devreotes, P.N. 1992. Structurally distinct and stage-specific adenyl cyclase genes play different roles in *Dictyostelium* development. *Cell.* **69**:305-315.
- Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., de Nadal, E. und Arino, J. 2000. The transcriptional response of yeast to saline stress. *J. Biol. Chem.* **275**:17249-17255.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C. und Saito, H. 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell.* **86**:865-875.

- Prassler, J., Murr, A., Stocker, S., Faix, J., Murphy, J. und Marriott, G. 1998. DdLIM is a cytoskeleton-associated protein involved in the protrusion of lamellipodia in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell.* **9**:545-559.
- Primpke, G., Iassonidou, V., Nellen, W. und Wetterauer, B. 2000. Role of cAMP-dependent protein kinase during growth and early development of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* **221**:101-111.
- Raper, K.B. 1935. *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agricult. Res.* **50**:135-147.
- Rehm, H. 1997. Der Experimentator: Proteinbiochemie. G. Fischer, Stuttgart.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M. und Hohmann, S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock - Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J. Biol. Chem.* **275**:8290-8300.
- Rivero, F., Koppel, B., Peracino, B., Bozzaro, S., Siegert, F., Weijer, C.J., Schleicher, M., Albrecht, R. und Noegel, A.A. 1996. The role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development. *J. Cell Sci.* **109**:2679-2691.
- Robison, G.A., Butcher, R.W. und Sutherland, E.W. 1968. Cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.* **37**:149-174.
- Rogers, K.C., Ginsburg, G.T., Mu, X., Gollop, R., Balint-Kurti, P., Louis, J.M. und Kimmel, A.R. 1997. The cAMP receptor gene family of *Dictyostelium discoideum*: expression, regulation, function, S. 163-172. In: *Dictyostelium-A Model System for Cell and Developmental Biology*. Maeda, Y., Inouye, K. und Takeuchi, I. (Hrsg.). Universal Academy Press, Tokyo.
- Roig, J., Huang, Z.D., Lytle, C. und Traugh, J.A. 2000. p21-activated protein kinase gamma-PAK is translocated and activated in response to hyperosmolarity - Implication of Cdc42 and



- phosphoinositide 3-kinase in a two-step mechanism for gamma-PAK activation. *J. Biol. Chem.* **275**:16933-16940.
- Roos, W. und Gerisch, G. 1976. Receptor-mediated adenylate cyclase activation in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* **68**:170-172.
- Rossier, C., Gerisch, G., Malchow, D. und Eckstein, F. 1978. Action of a slowly hydrolysable cyclic AMP analogue on developing cells of *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Sci.* **35**:321-338.
- Rudolph, J., Tolliday, N., Schmitt, C., Schuster, S.C. und Oesterhelt, D. 1995. Phosphorylation in halobacterial signal transduction. *EMBO J.* **14**:4249-4257.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **74**:560-564.
- Sauermost, R. 1994. Herder-Lexikon der Biologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Schindler, J. und Sussman, M. 1979. Inhibition by ammonia of intracellular cAMP accumulation in *Dictyostelium discoideum*: its significance for the regulation of morphogenesis. *Devel. Genet.* **1**:13-20.
- Schuster, S.C., Noegel, A.A., Oehme, F., Gerisch, G. und Simon, M.I. 1996. The hybrid histidine kinase DokA is part of the osmotic response system of *Dictyostelium*. *EMBO J.* **15**:3880-3889.
- Shaulsky, G., Escalante, R. und Loomis, W.F. 1996. Developmental signal transduction pathways uncovered by genetic suppressors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **93**:15260-15265.
- Shaulsky, G., Fuller, D. und Loomis, W.F. 1998. A cAMP-phosphodiesterase controls PKA-dependent differentiation. *Development.* **125**:691-699.
- Shieh, J.C., Wilkinson, M.G., Buck, V., Morgan, B.A., Makino, K. und Millar, J.B.A. 1997. The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes Dev.* **11**:1008-1022.

- Siegert, F. und Weijer, C. 1997. Control of cell movement during multicellular morphogenesis, S. 425 - 436. In: *Dictyostelium - A Model System for Cell and Developmental Biology*. Maeda, Y., Inouye, K., Takeuchi, I. (Hrsg.). Universal Academy Press, Tokyo.
- Simon, M.N., Pelegri, O., Veron, M. und Kay, R.R. 1992. Mutation of protein kinase A causes heterochronic development of *Dictyostelium*. *Nature*. **356**:171-172.
- Singleton, C.K., Zinda, M.J., Mykytko, B. und Yang, P. 1998. The histidine kinase *dhkC* regulates the choice between migrating slugs and terminal differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* **203**:345-357.
- Soderbom, F., Anjard, C., Iranfar, N., Fuller, D. und Loomis, W.F. 1999. An adenylyl cyclase that functions during late development of *Dictyostelium*. *Development*. **126**:5463-5471.
- Sonnhammer, E.L.L. und Kahn, D. 1994. Modular arrangement of proteins as inferred from analysis of homology. *Protein Sci.* **3**:482-492
- Stock, J.B., Surette, M.G., Levit, M. und Park, P. 1995. Two-component signal transduction systems: structure-function relationships and mechanism of catalysis, S. 25-51. In: Two-Component Signal Transduction. Hoch, J.A. und Silhavy, T.J. (Hrsg.). ASM press, Washington, DC.
- Sutherland, E.W. und Rall, T.W. 1958. Fractionation and characterization of a cyclic adenosine ribonucleotide formed by tissue particles. *J. Biol. Chem.* **232**:1077-1091.
- Swanson, R.V., Schuster, S.C., and Simon, M.I. 1993. Expression of CheA fragments which define domains encoding kinase, phosphotransfer and CheY binding activities. *Biochemistry*. **32**:7623-7629.
- Tan, J.L., Ravid, S. und Spudich, J.A. 1992. Control of nonmuscle myosins by phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**:721-759.
- Tang, W.J. und Gilman, A.G. 1992. Adenylyl cyclases. *Cell*. **70**:869-872.
- Taylor, S.S., Buechler, J.A. und Yonemoto, W. 1990. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**:971-1005.

- Thomason, P.A., Traynor, D., Cavet, G., Chang, W.-T., Harwood, A.J. und Kay, R.R. 1998. An intersection of the cAMP/PKA and two-component signal transduction systems in *Dictyostelium*. *EMBO J.* **17**:2838-2845.
- Thomason, P.A., Traynor, D., Stock, J.B. und Kay, R.R. 1999. The RdeA-RegA system, a eukaryotic phospho-relay controlling cAMP breakdown. *J. Biol. Chem.* **274**:27379-27384.
- Traynor, D., Kessin, R.H. und Williams, J.G. 1992. Chemotactic sorting to cAMP in the multicellular stages of *Dictyostelium* development. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **89**:8303-8307.
- Tsutsumi, T., Ushiro, H., Kosaka, T., Kayahara, T. und Nakano, K. 2000. Proline- and alanine-rich Ste20-related kinase associates with F-actin and translocates from the cytosol to cytoskeleton upon cellular stresses. *J. Biol. Chem.* **275**:9157-9162.
- Uhl, M.A. und Miller, J. 1996. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J.* **15**:1028-1036.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T. und Shinozaki, K. 1999. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell.* **11**:1743-1754.
- van Es, S., Viridy, K.J., Pitt, G.S., Meima, M., Sands, T.W., Devreotes, P.N., Cotter, D.A. und Schaap, P. 1996. Adenylyl cyclase G, an osmosensor controlling germination of *Dictyostelium* spores. *J. Biol. Chem.* **271**:23623-23625.
- van Haastert, P.J.M. 1997. Transduction of the chemotactic cAMP signal across the plasma membrane, S. 173-191. In: *Dictyostelium-A Model System for Cell and Developmental Biology*. Maeda, Y., Inouye, K. und Takeuchi, I. (Hrsg.). Universal Academy Press, Tokyo.
- van Haastert, P.J. und Kien, E. 1983. Binding of cAMP derivatives to *Dictyostelium discoideum* cells. Activation mechanism of the cell surface cAMP receptor. *J. Biol. Chem.* **258**:9636-9642.

- Verkerke-van Wijk, I. und Schaap, P. 1997. cAMP, a signal for survival, S. 145 - 162. In: *Dictyostelium - A Model System for Cell and Developmental Biology*. Maeda, Y., Inouye, K., Takeuchi, I. (Hrsg.). Universal Academy Press, Tokyo.
- Walsh, D.A., Clippinger, M.S., Sivaramakrishnan, S. und McCullough, T.E. 1979. Cyclic adenosine monophosphate dependent and independent phosphorylation of sarcolemma membrane proteins in perfused rat heart. *Biochemistry*. **18**:871-877.
- Walsh, D.A. und van Patten, S.M. 1994. Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. *FASEB J.* **8**:1227-1236.
- Wang, N., Shaulsky, G., Escalante, R. und Loomis, W.F. 1996. A two-component histidine kinase gene that functions in *Dictyostelium* development. *EMBO J.* **15**:3890-3898.
- Weiner, M.P., Anderson, C., Jerpseth, B., Wells, S., Johnson-Browne, B. und Vaillancourt, P. 1994. *Strategies*. **7**:41-43.
- Williams, G.B., Elder, E.M. und Sussman, M. 1984. Modulation of the cAMP relay in *Dictyostelium discoideum* by ammonia and other metabolites: possible morphogenetic consequences. *Dev. Biol.* **105**:377-388.
- Williams, K.L. und Newell, P.C. 1976. A genetic study of aggregation in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics*. **82**:287-307.
- Wu, L., Valkema, R., van Haastert, P.J. und Devreotes, P.N. 1995. The G protein beta subunit is essential for multiple responses to chemoattractants in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* **129**:1667-1675.
- Wurgler-Murphy, S.M. und Saito, H. 1997. Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem. Sci.* **22**:172-176.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. und Somero, G.N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*. **217**:1214-1222.
- Zinda, M.J. und Singleton, C.K. 1998. The hybrid histidine kinase *dhkB* regulates spore germination in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* **196**:171-183.

- Zischka, H. 2000. Charakterisierung der Grubenmembran von *Crotalus atrox* und Etablierung der Proteomanalyse am Beispiel der hyperosmotischen Stressantwort von *Dictyostelium discoideum*. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Zischka, H., Oehme, F., Pintsch, T., Ott, A., Keller, H., Kellermann, J. und Schuster, S.C. 1999. Rearrangement of cortex proteins constitutes an osmoprotective mechanism in *Dictyostelium*. *EMBO J.* **18**:4241-4249.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Abteilung von Prof. Dr. D. Oesterhelt unter Anleitung von Dr. S.C. Schuster durchgeführt.

Dr. Stephan C. Schuster danke ich für die Überlassung des Themas, seine stete (auch finanzielle) Unterstützung, die vielfältigen Anregungen und den Freiraum, den er mir liess.

Prof. Dr. Dieter Oesterhelt möchte ich danken für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung und die materielle, ideelle und animierende Unterstützung in diesen Jahren.

Dr. Gerisch und seiner Abteilung danke ich für Rat und Tat bei der Arbeit mit *Dictyostelium discoideum*-Zellen.

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung Membranbiochemie, die mich freundlich, hilfsbereit und aufmunternd unterstützten und begleiteten; insbesondere

Boris für Ansporn, Ideen, Diskussionen, ... (es war Reibungskletterei at its best!);

Benjamin für seine Anregungen und Hirngespinnste;

Tanja für ein Miteinander inner- und außerhalb des Labors, wie ich es nur Freunden wünsche;

Nadja, Hans und Jörg für entscheidende Unterstützung zur rechten Zeit;

Felix, Judith und insbesondere Heike für eine Zusammenarbeit, ohne die das hier nicht wäre;

den Praktikantinnen Sabine und Silke;

und und und... (nicht zu vergessen: dem Laufteam D.O., B.B., I.B., W.G., C.K., B.M., C.R. und dem Kletterteam I.B., B.B., B.M., S.O., B.Q.).

Ich danke Christin und Ernst,

vielen Dank meiner Mutter

und allen, die mir nicht böse sind, dass sie hier nicht (gebührend) erwähnt wurden.

mea culpa!

# Lebenslauf

## Biographische Daten

Alexander Ott

geboren am 26.07.1970

in München

## Schulbildung

1976-1980                      Grundschule am Niederbronner Weg, Fürstenfeldbruck

1980-1989                      Graf-Rasso-Gymnasium, Fürstenfeldbruck

1989-1990                      Zivildienst

## Akademische Ausbildung

1990-1991                      Studium der Philosophie, Universität Augsburg

1991-1997                      Studium der Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München

1997                              Diplomarbeit  
am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Abteilung  
Prof. Dr. Oesterhelt

21.07.1997                      Diplom

seit 01.10.1997                      Doktorarbeit  
am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Abteilung  
Prof. Dr. Oesterhelt unter Anleitung von Dr. S.C. Schuster